





**Étude de l'activité cosméceutique de l'*Achillea millefolium* L. et de la *Brasenia schreberi* J.F. Gmel.**

**par Jessica Fortin-Mimeault**

**Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi en vue de l'obtention du grade de Maître  
(M. Sc.) en Ressources renouvelables – Biologie**

Québec, Canada

© Jessica Fortin-Mimeault, 2021

## RÉSUMÉ

Depuis quelques décennies, les consommateurs sont à la recherche de produits cosmétiques écoresponsables, d'origine naturelle et ayant prouvé leur efficacité. Ceci pousse l'industrie cosmétique à chercher de nouveaux ingrédients dans le règne végétal. Les végétaux sont riches en composés chimiques de structures variées ayant des propriétés biologiques diverses. La forêt boréale québécoise est un réservoir riche en végétaux qui se retrouvent dans la médecine traditionnelle de peuples à travers le monde. L'Achillée millefeuille (*Achillea millefolium* L.) et la Brasénie de Schreber (*Brasenia schreberi* J.F. Gmel) font partie des plantes retrouvées dans les médecines traditionnelles autochtone et chinoise, respectivement. Dans le cadre de ce projet, le potentiel cosméceutique de ces deux plantes a été étudié. Premièrement, l'activité biologique des extraits et des huiles essentielles de l'Achillée millefeuille sauvage et cultivée ont été comparées. Il s'avère que l'Achillée millefeuille cultivée possède un rendement très faible en huile essentielle, tandis que celle sauvage a un rendement de 0,0918%. L'huile essentielle de l'Achillée millefeuille sauvage possède des propriétés antioxydantes ( $IC_{50}$  de  $0,19 \pm 0,03$  % (v/v)), anti-inflammatoires ( $IC_{50}$  de  $0,010 \pm 0,001$  % (v/v)) et antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* ( $MIC_{90}$  de  $2,9 \pm 0,5$  % (v/v)). Quant aux extraits d'Achillée millefeuille, l'extrait éthanolique obtenu à partir de feuilles de la plante cultivée présente des propriétés anti-inflammatoires ( $IC_{50}$  de  $29 \pm 7$  µg/mL) et antioxydantes ( $IC_{50}$  de  $0,22 \pm 0,01$  µg/mL) supérieures à celles de l'extrait éthanolique de feuilles provenant de la plante sauvage. Cette différence d'activité pourrait être due à une différence au niveau de la teneur en acide chlorogénique, un composé ayant des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes ; l'extrait éthanolique de feuilles cultivées contient 1,4 fois plus d'acide chlorogénique que celui de feuilles sauvages. L'extrait éthanolique obtenu à partir de feuilles de la plante cultivée pourrait être intéressant pour développer un produit anti-âge. Lors du deuxième volet du projet, les effets protéiques et transcriptomiques d'un extrait hydroalcoolique de Brasénie de Schreber ont été étudiés sur un substitut de peau humaine et sur des fibroblastes dermiques humains (WS-1), respectivement. L'extrait de Brasénie de Schreber augmente le niveau d'expression protéique de l'involucrine (3,8 fois), la loricrine (3,1 fois), la filaggrine (2,9 fois), l'aquaporine-3 (5 fois) et du collagène-1 (2,7 fois) par rapport au substitut de peau humaine non traité. Cet extrait présente également des propriétés antioxydantes ( $IC_{50}$  de  $0,28 \pm 0,02$  µg/mL) et anti-inflammatoires (inhibe à  $100 \pm 6$  % la production d'oxyde nitrique avec une concentration de 160 µg/mL). Les résultats obtenus avec l'extrait de Brasénie de Schreber sur les cellules humaines suggèrent que cet extrait pourrait prévenir le vieillissement de la peau en stimulant le renouvellement de l'épiderme, en améliorant l'hydratation de la peau ainsi que sa fonction barrière et en diminuant les altérations à la structure dermique. Pour ce qui est de l'étude de l'effet transcriptomique de la Brasénie de Schreber, elle permet de donner quelques pistes sur les mécanismes d'action de l'extrait qui devront être explorées plus en profondeurs. En fait, puisque l'extrait affecte l'expression génique de EGR1, EGR3 et DDIT4, il serait intéressant lors de prochaines études de vérifier comment l'extrait de Brasénie de Schreber affecte la synthèse du collagène, le cycle circadien, la différenciation des kératinocytes ainsi que comment l'extrait protège les cellules du stress oxydatif. En conclusion, nos résultats montrent que l'Achillée millefeuille et la Brasénie de Schreber possèdent tous les deux des propriétés anti-âge intéressantes.

## TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ .....	ii
TABLE DES MATIÈRES.....	iii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES .....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION.....	1
Problématique.....	1
Objectif principal.....	4
Objectifs secondaires .....	4
Structure du mémoire.....	6
CHAPITRE 1 REVUE DE LITTÉRATURE .....	7
1.1    Achillée millefeuille .....	7
1.1.1    Description de la plante .....	7
1.1.2    Usages traditionnels.....	8
1.1.3    Propriétés pharmacologiques .....	10
1.2    Brasénie de Schreber .....	12
1.2.1    Description de la plante .....	12
1.2.2    Usages traditionnels.....	12
1.2.3    Propriétés pharmacologiques .....	13
CHAPITRE 2 COMPARAISON DU POTENTIEL COSMÉCEUTIQUE DE L'ACHILLÉE MILLEFEUILLE CULTIVÉE À CELLE SAUVAGE DU SAGUENAY-LAC-SAINT-JEAN, QUÉBEC, CANADA .....	15
2.1    Résumé.....	15
COMPARISON OF WILD AND CULTIVATED <i>ACHILLEA MILLEFOLIUM</i> FROM THE SAGUENAY-LAC-ST-JEAN REGION (QUEBEC, CANADA) FOR COSMETIC USE .....	17
2.2    Abstract.....	18
2.3    Introduction .....	19
2.4    Materials and methods .....	20
2.4.1    Plant material.....	20
2.4.2    Preparation of essential oils and solvent extracts .....	20
2.4.3    Thin-layer chromatography (TLC) conditions.....	21

2.4.4	High-performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometer (HPLC-MS) conditions .....	21
2.4.5	Gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS) conditions.....	21
2.4.6	Gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID) conditions.	22
2.4.7	Cell culture .....	22
2.4.8	Preparation of the tested samples.....	22
2.4.9	Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay.....	23
2.4.10	Cellular antioxidant assay .....	23
2.4.11	Anti-inflammatory assay .....	24
2.4.12	Cytotoxic assay .....	24
2.4.13	Antibacterial assay – Hydrophobic.....	25
2.4.14	Antibacterial assay – Broth microdilution assay .....	26
2.4.15	Statistical analysis .....	26
2.5	Results.....	26
2.5.1	<i>Achillea millefolium</i> leaf extracts .....	26
2.5.2	<i>Achillea millefolium</i> flower extracts.....	28
2.5.3	<i>Achillea millefolium</i> essential oil.....	29
2.6	Discussion.....	31
2.7	Conclusion.....	34
2.8	Supplementary results .....	35
	References.....	39
	CHAPITRE 3 ÉTUDE DU POTENTIEL COSMÉCEUTIQUE D'UN EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE BRASÉNIE DE SCHREBER ( <i>BRASENIA SCHREBERI</i> ) .....	45
3.1	Résumé.....	45
	POTENTIAL COSMECEUTICAL EFFECTS OF A HYROALCOHOLIC <i>BRASENIA SCHREBERI</i> EXTRACT .....	46
3.2	Abstract .....	47
3.3	Introduction .....	47
3.4	Materials and methods .....	48
3.4.1	Extract preparation .....	48
3.4.2	Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay.....	49
3.4.3	Cellular antioxidant assay .....	49
3.4.4	Anti-inflammatory assay .....	50
3.4.5	Cytotoxicity assay .....	50

3.4.6	Patient and biopsies .....	51
3.4.7	MTT assay.....	52
3.4.8	<i>In vitro</i> reconstructed skin .....	52
3.4.9	Histology and immunofluorescence stainings .....	53
3.5	Results .....	54
3.5.1	Antioxidant activity of <i>Brasenia schreberi</i> extract .....	54
3.5.2	Cytotoxicity and anti-inflammatory activity of <i>Brasenia schreberi</i> extract .....	55
3.5.3	Effect of <i>Brasenia schreberi</i> extract on the expression of proteins of cosmeceutical interest .....	57
3.6	Discussion.....	58
3.7	Conclusion .....	61
3.9	Supplementary materials and methods.....	62
3.9.1	Plant Extract .....	62
3.9.2	Cell culture .....	62
3.9.3	ARN extraction .....	62
3.9.4	RT-qPCR.....	63
3.9.5	Statistical analysis .....	63
3.10	Supplementary results .....	64
	References.....	65
	CHAPITRE 4 ÉVALUATION DE L'EFFET D'UN EXTRAIT HYDROÉTHANOLIQUE DE BRASÉNIE DE SCHREBER SUR LE TRANSCRIPTOME DE FIBROBLASTES DE PEAU HUMAINE .....	71
4.1	Introduction .....	71
4.2	Matériels et méthodes.....	73
4.2.1	Culture cellulaire .....	73
4.2.2	Traitements .....	73
4.2.3	Extraction d'ARN .....	74
4.2.4	Analyse des profils d'expression des ARNm par biopuce .....	74
4.3	Résultats et discussion .....	74
4.4	Conclusion .....	79
	CONCLUSION .....	80
	LISTE DE RÉFÉRENCES .....	82

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Usages topiques de l'Achillée millefeuille à travers le monde .....	8
Tableau 2 : Propriétés biologiques de l'Achillée millefeuille pour la peau .....	11
Tableau 3 : Usages traditionnels de la Brasénie de Schreber .....	13
Tableau 4 : Propriétés de la Brasénie de Schreber .....	14
Table 5 : Yield and biological activity screening of the different <i>A. millefolium</i> leaf extracts .....	27
Table 6 : Yield and biological activity screening of the different <i>A. millefolium</i> flower extracts .....	29
Table 7 : Identification of the chemical composition of the wild <i>A. millefolium</i> essential oil with GC-MS .....	30
Table 8 : Yield and biological activity of <i>A. millefolium</i> essential oil .....	31
Table 9 : Pharmacological effect of compounds identified in <i>A. millefolium</i> ethanolic extracts .....	32
Table 10 : Identified compounds in <i>A. millefolium</i> ethanolic extracts .....	38
Table 11 : Surface area of the different compounds identified in <i>A. millefolium</i> ethanolic extracts .....	39
Table 12 : Studied genes of cosmeceutical interest .....	63

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : TLC of wild (A) and cultivated (B) leaf extract using the mobile phase CHCl <sub>3</sub> : MeOH : H <sub>2</sub> O: HCOOH (50: 15 : 1: 0.1) after revelation with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in the visible (above) and with NP/PEG at 365 nm (below). Apigenin (A), methanolic extract (M), ethanolic extract (E), hydroethanolic extract (3:1) (E:H 3:1), hydroethanolic extract (1:1) (E:H 1:1) and aqueous extract (H). .....	35
Figure 2 : TLC of wild (A) and cultivated (B) flower extracts using the mobile phase CHCl <sub>3</sub> : MeOH : H <sub>2</sub> O: HCOOH (50: 15 : 1: 0.1) after revelation with H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> in the visible (above) and with NP/PEG at 365 nm (below). Apigenin (A), methanolic extract (M), ethanolic extract (E), hydroethanolic extract (3:1) (E:H 3:1), hydroethanolic extract (1:1) (E:H 1:1) and aqueous extract (H). .....	36
Figure 3 : Chromatograms at 280 nm for the wild (A) and cultivated (B) leaf ethanol extracts and the wild (C) and cultivated (D) flower ethanol extracts.....	37
Figure 4 : Chemical structure of compounds 1, 2, 5 and 6 .....	38
Figure 5 : UV spectra of the identified compounds in the <i>A. millefolium</i> ethanolic extracts. Chlorogenic acid (A), rutin (B), dicaffeoylquinic acids (C and D), luteolin (E) and apigenin (F). .....	38
Figure 6 : Antioxidant activity of the <i>B. schreberi</i> extract and quercetin after absorption (60 min) by cells and subsequent exposition (90 min) to 200 µM t-BuOOH, using the cell-based assay. Data shown as the means ± standard deviation from one experiment (n=6). .....	55
Figure 7 : Effect of the <i>B. schreberi</i> extract on the cytotoxicity (A) and the nitric oxide production (B) after stimulation of the murine macrophage cell line RAW 264.7 with lipopolysaccharide. NG-nitro-L-arginine methyl ester (62.5 µg/mL) was used as a standard. Values are reported as mean ± standard deviation and are representative of an experiment (n=6). .....	56
Figure 8 : Cytotoxicity of the <i>B. schreberi</i> extract on human skin fibroblast cell line WS-1. Data shown as the means ± standard deviation from one experiment (n=6). .....	57
Figure 9 : Expression of collagen-1 on day seven of the air-liquid interface in skin substitutes treated with 50 µg/mL of <i>B. schreberi</i> extract (treated) or not (control) (N=1) .....	58
Figure 10 : Expression of aquaporin-3, involucrin, filaggrin and loricrin on day 21 of the air-liquid interface in skin substitutes treated with 50 µg/mL of <i>B. schreberi</i> extract (treated) or not (control) (N=1).....	58
Figure 11 : Effect of 50 µg/mL of <i>B. schreberi</i> extract on collagen synthesis in NHDF (N=1) .....	64
Figure 12 : Effect of 50 µg/mL <i>B. schreberi</i> extract on aquaporin-3, filaggrin and involucrin in NHEK (N=1)...	65
Figure 13 : Les étapes principales d'analyses des profils des transcrits à l'aide d'une biopuce à ADN .....	72
Figure 14 : Expression génique en fonction de la concentration de l'extrait de Brasénie après une heure de traitement .....	75
Figure 15 : Effet de l'extrait de Brasénie sur expression génique de DDIT4 en fonction de la concentration et du temps .....	78



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

°C – Degré Celsius

µg – Microgramme

µL – Microlitre

µm - Micromètre

µM – Micromolaire

µmol – Micromole

3T3 – Lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires murins

*A. millefolium* – *Achillea millefolium*

A<sub>230</sub> – Absorbance à 230 nm

A<sub>260</sub> – Absorbance à 260 nm

A<sub>280</sub> – Absorbance à 280 nm

AAPH – 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride

ADN – Acide désoxyribonucléique

AQP3 – Aquaporine-3

ARN – Acide ribonucléique

ARNm – Acide ribonucléique messenger

cDNA – Complementary deoxyribonucleic acid

CFU – Colony forming units

CHCl<sub>3</sub> – Chloroforme

CO<sub>2</sub> – Dioxyde de carbone

COL1A1 – Collagène de type I α1

COL3A1 – Collagène de type III α1

COX-2 – Cyclooxygénase-2

DCFH – 2',7'-dichlorofluorescein

DCFH-DA – 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate

DDIT4 – Gène *DNA Damage Inducible Transcript 4*

DDIT4 – Protéine DNA Damage Inducible Transcript 4

DMEM – Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium

DMSO – Diméthyle sulfoxyde

DNA – Deoxyribonucleic acid

*DUSP6* – Gène *Dual specificity phosphatase 6*

DUSP6 – Protéine Dual specificity phosphatase 6

*E. coli.* – *Escherichia coli*

*EGR1* – Gène *Early Growth Response 1*

EGR1 – Protéine Early Growth Response 1

*EGR3* – Gène *Early Growth Response 3*

EGR3 – Protéine Early Growth Response 3

ERK – Extracellular signal-regulated kinase

ERK 1/2 – Extracellular signal-regulated kinases 1/2

EtOH – Éthanol

FID – Détecteur d'ionisation de flamme

*FLG* – Filaggrine

g – Gramme

GC – Chromatographie en phase gazeuse

GM-CSF – Facteur de stimulation des colonies granulocytes-macrophages

H<sub>2</sub>O – Eau

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> – Acide sulfurique

HBSS – Hanks' balanced salt solution

HCOOH – Acide formique

HPLC – Chromatographie liquide à haute performance

*HPRT1* – Gène *hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*

IC<sub>20</sub> – Concentration qui inhibe 20%

IC<sub>50</sub> – Concentration qui inhibe 50%

*IER2* – Gène *Immediate early response gene 2*

IER2 – Protéine Immediate early response gene 2

iNOS – Oxyde nitrique synthase inductible

IVL – Involucrine

L-NAME – N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride

LOEX – Centre de recherche en organogénèse expérimentale de l'Université Laval

LPS – Lipopolysaccharide

m – Mètre

m/z – Rapport masse sur charge

MeOH – Méthanol

mg – Milligramme

MIC<sub>90</sub> – Concentration minimale pour inhiber 90% de la croissance bactérienne

min – Minute

mL – Millilitre

mM – Millimolaire

mm – Millimètre

MS – Spectromètre de masse

mTOR – Mammalian target of rapamycin

MTT – MTT 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaNO<sub>2</sub> – Nitrite de sodium

ng – Nanogramme

NHDF – Lignée cellulaire de fibroblastes dermiques humains normaux

NHEK – Lignée cellulaire de kératinocytes humains normaux

nm – Nanomètre

NMF – Facteur d'hydratation naturel

NO – Oxyde nitrique

NP/PEG – Solution de révélation de 2-aminoethyl-diphenylborinate avec polyéthylène glycol

ORAC – Capacité d'absorption des radicaux oxygénés

PBS – Solution saline tamponnée au phosphate

PCR – Réaction en chaîne de la polymérase

*PRAMEF8* – Gène *PRAME Family Member 8*

RAW 264.7 – Lignée cellulaire de macrophages murins

RNA – Ribonucleic acid

RT-qPCR – Réaction en chaîne à la polymérase en temps réel

*S. aureus* – *Staphylococcus aureus*

SDS – Sodium dodecylsulphate

*TBP* – Gène *TATA-binding protein*

t-BuOOH – t-butyl hydroperoxyde

TE – Équivalent Trolox

TGF- $\beta$  – Transforming growth factor beta

TLC – Chromatographie sur couche mince

UV – Ultraviolet

VIH – Virus de l'immunodéficience humaine

WS-1 – Lignée cellulaire de fibroblastes dermiques humains normaux

## **REMERCIEMENTS**

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur de recherche Pr Jean Legault et mon codirecteur Pr André Pichette de m'avoir fait confiance avec ce projet de maîtrise et d'avoir accepté que je complète mon DESS en cosmétologie pendant ma période de rédaction de mémoire. Je remercie la compagnie Boréaceutique d'avoir financé le début de ma maîtrise.

J'aimerais également remercier tous mes collègues du LASEVE qui ont su répondre à toutes mes questions et à m'aider durant mon cheminement académique. Je tiens particulièrement à remercier François Simard et Alexis St-Gelais qui m'ont aidée au niveau de la partie chimie de mon projet (extractions des plantes et analyses de la composition chimique). Pour la partie biologie de ma maîtrise, je tiens à remercier en particulier Audrey Bélanger, Karl Girard-Lalancette et Catherine Dussault pour leur patience et leurs conseils.

Je veux également remercier tous ceux qui, de près ou de loin, m'ont supportée tout au long de ma maîtrise. Merci beaucoup à mes amies, mes parents, mes sœurs et mon copain qui ont su m'encourager durant les hauts et les bas à continuer et à persévérer.

## INTRODUCTION

### Problématique

Le vieillissement est un processus inévitable qui entraîne une perte progressive des fonctions maximales, de la résistance au stress, de l'efficacité métabolique et du potentiel adaptatif des différents organes du corps (Tigges *et al.* 2014). Vieillir entraîne non seulement des changements au niveau de l'aspect de la peau, mais également des pertes de fonctions au niveau de la fonction barrière, de la réponse aux blessures, de la perméabilité et de la fonction immune (Farage *et al.* 2007). L'inflammation et le stress oxydatif sont impliqués dans le vieillissement et sont interdépendants (Biswas 2016). Ensemble, ils mènent à la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) du derme et à des dommages aux macromolécules des cellules (acides nucléiques, protéines et lipides) (Zhuang et Lyga 2014; Rinnerthaler *et al.* 2015). La peau jeune est capable de répondre efficacement au stress oxydatif via des mécanismes de défenses et de réparations, alors que chez celle âgée, la réponse au stress oxydatif est souvent altérée (Labunskyy et Gladyshev 2013). Ceci résulte en l'accumulation de dommages cellulaires chez les peaux âgées qui se traduisent éventuellement en signes cliniques du vieillissement (ex : rides, amincissement de la peau, diminution de l'élasticité de la peau, etc.) (Starr et Starr 2014; Rinnerthaler *et al.* 2015). Également, les dommages causés par le stress oxydatif mènent à une réponse inflammatoire, qui entraîne l'activation des métalloprotéases matricielles (MMPs). Ces dernières sont responsables de la dégradation de la MEC (Pillai *et al.* 2005).

Depuis quelques décennies, les consommateurs ont une tendance à aller vers ce qui est plus naturel (Duber-Smith 2011). En fait, ils sont plus conscients des effets nocifs sur l'environnement et la santé des ingrédients cosmétiques dérivés de la pétrochimie tels que le butylhydroxyanisole (BHA), le butyl hydroxytoluène (BHT) et l'oxybenzone (Amberg et Fogarassy 2019; Schneider et Lim 2019; David Suzuki Foundation 2020). Par ailleurs, le mouvement végétaliste influence de plus en plus les consommateurs et les sensibilise à l'impact des produits contenant des ingrédients d'origine animale sur l'environnement (Credence Research 2019). Cette tendance vers des produits cosmétiques naturels

pousse donc l'industrie cosmétique à développer de nouveaux ingrédients d'origine végétale et à développer de nouveaux produits plus naturels et écoresponsables (Gasco-Buisson 2017).

Les végétaux produisent une importante variété de composés chimiques de structures variées (Farnsworth 1994; Atanasov *et al.* 2015). Chez les plantes, il existe deux types de métabolites : les métabolites primaires classés en quatre grandes catégories (glucides, lipides, protéines et acides nucléiques), ainsi que les métabolites secondaires, tels que les composés phénoliques, les composés terpéniques, les phytostéroïdes, les saponines et les alcaloïdes (Bruneton 2009). Les métabolites secondaires sont des composés chimiques nécessaires pour l'interaction des plantes avec leur environnement; ils jouent un rôle de défense contre les stress biotiques (bactéries, fungus, insectes et animaux) et abiotiques (sécheresse, carences nutritionnelles et radiation) (Kliebenstein 2013; Borges *et al.* 2017). Ainsi, les métabolites secondaires d'une plante donnée varient en réponse à son environnement tel que le sol, le climat et la saison (Borges *et al.* 2017). Les métabolites secondaires sont souvent responsables des diverses activités biologiques des végétaux (Borges *et al.* 2017).

La médecine traditionnelle des différents peuples à travers le monde est basée, entre autres, sur l'usage des plantes pour traiter différents problèmes de santé. Ces plantes médicinales sont utilisées depuis des milliers d'années et, de nos jours, elles représentent une source importante de traitements médicaux pour plusieurs pays (WHO 2013). Pour développer de nouveaux produits efficaces, il n'est guère surprenant que l'industrie cosmétique se tourne vers la médecine traditionnelle. Cette dernière est le résultat de l'accumulation de savoir populaire depuis des milliers d'années sur les activités biologiques possibles de plantes (Cox 1994). Ainsi, la médecine traditionnelle donne de bonnes indications sur les plantes qui contiennent probablement des substances biologiquement actives telles que des métabolites secondaires ainsi que le type d'extrait (Prance 1994).

La forêt boréale est une ressource riche en végétaux qui recouvre plus de la moitié du Canada (Ministre de l'Environnement 2006). Certains de ces végétaux sont utilisés dans la médecine moderne

et dans des produits cosmétiques. Notamment, le paclitaxel, qui est utilisé comme agent chimiothérapeutique, a été extrait de l'écorce d'ifs retrouvés dans la forêt boréale (Fédération des producteurs forestiers du Québec 2019). De plus, l'extrait de thé du Labrador, une plante présente dans la forêt boréale, s'avère être l'ingrédient actif majeur de la gamme Age Control Supreme de Lise Watier pour son action anti-âge (Lise Watier Cosmétiques 2020). À l'heure actuelle, bien que plusieurs végétaux soient étudiés pour leurs propriétés biologiques, très peu de plantes de la forêt boréale québécoise sont utilisées par les industries cosmétiques et pharmaceutiques. Il est donc important d'approfondir nos connaissances sur les activités biologiques des plantes de la forêt boréale afin de mieux les valoriser. Tel que mentionné précédemment, la médecine traditionnelle est un bon point de départ pour sélectionner des plantes d'intérêts.

Dans le cadre de ce projet, nous nous attarderons sur deux plantes qui sont particulièrement intéressantes. La première plante sélectionnée est l'Achillée millefeuille (*Achillea millefolium* L.), une plante que l'on retrouve dans la médecine traditionnelle autochtone (Moerman 2003). Cette plante a été précédemment étudiée au sein du laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE). Lors de ces études préliminaires, il a été montré que l'Achillée millefeuille possède des activités biologiques intéressantes pour le secteur cosmétique, telles que des activités anti-inflammatoires et antioxydantes. Bien que récolter de l'Achillée millefeuille dans la nature est moins dispendieux que de la cultiver, la culture de cette plante présente de nombreux avantages. En effet, sa culture pourrait protéger l'espèce sauvage ainsi que limiter la variabilité au niveau de l'activité biologique de la plante entre chaque lot de production (Lubbe et Verpoorte 2011). Pourtant, il n'y a que très peu d'études qui comparent l'Achillée millefeuille cultivée à celle sauvage (Agnihotri *et al.* 2005), et à notre connaissance, il ne semble pas y avoir d'études publiées comparant l'activité biologique d'extraits d'Achillée millefeuille cultivée aux extraits de la plante sauvage. Ainsi, il pourrait être intéressant de comparer l'activité biologique de la plante cultivée à celle sauvage afin d'explorer la possibilité de la mise en culture de la plante et également développer de nouveaux extraits anti-âge.



Pour ce qui est de la seconde plante, la Brasénie de Schreber (*Brasenia schreberi* J.F. Gmel) se retrouve dans la médecine traditionnelle chinoise (Zhou *et al.* 2011). Tout comme l'Achillée millefeuille, la Brasénie de Schreber a également été précédemment étudiée au sein du LASEVE et il a été démontré qu'elle possède des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Legault *et al.* 2011). Jusqu'à maintenant, il ne semble pas y avoir d'articles publiés sur les effets de la Brasénie de Schreber sur des substituts de peau humaine. Il serait donc intéressant d'étudier plus en profondeur l'extrait de Brasénie sur les protéines d'intérêt dans le secteur cosmétique comme le collagène au niveau des fibroblastes de la peau et des marqueurs de différenciation pour les kératinocytes. Il serait également pertinent d'étudier son effet sur le transcriptome des cellules de la peau afin de mieux comprendre les différents mécanismes d'action de l'extrait. Ceci pourrait expliquer, entre autres, comment l'extrait peut entraîner une réponse anti-inflammatoire ou antioxydante, ou encore, découvrir de nouveaux effets cosméceutiques de l'extrait.

### **Objectif principal**

L'objectif principal de ce projet est d'étudier le potentiel cosméceutique de l'Achillée millefeuille et de la Brasénie de Schreber.

### **Objectifs secondaires**

Les objectifs secondaires de ce projet se divisent en deux volets en fonction des plantes étudiées.

- A. Pour l'Achillée millefeuille (*Achillea millefolium*), l'objectif secondaire est de comparer des extraits et des huiles essentielles de la plante sauvage à celle cultivée.
  - I. Préparer les extraits et les huiles essentielles de l'Achillée millefeuille par macération et entrainement à la vapeur, respectivement.

- II. Évaluer les activités biologiques pour chacun des extraits et huiles essentielles. Plus précisément, l'activité antioxydante, anti-inflammatoire, antibactérienne et la cytotoxicité ont été étudiées lors de ce projet.
  - III. Analyser la composition chimique des extraits et des huiles essentielles par chromatographie sur couche mince, chromatographie liquide à haute performance et chromatographie en phase gazeuse.
- B. Pour la Brasénie de Schreber (*Brasenia schreberi*), les objectifs secondaires sont d'étudier l'effet d'un extrait de la plante sur les protéines et le transcriptome des cellules de la peau.
- I. Évaluer l'effet de l'extrait de la Brasénie de Schreber sur des substituts de peau saine, des analyses par immunofluorescences de différents marqueurs. Plus précisément, le changement des niveaux d'expression de collagène-1, de l'involucrine, de la loricrine, de la filaggrine et de l'aquaporine-3 a été évalué avec des substituts de peau traités et non traités avec l'extrait.
  - II. Étudier l'effet transcriptomique de la Brasénie de Schreber sur les fibroblastes de la peau.
    - a. Traiter les cellules WS-1 à différentes concentrations et à différents temps d'incubations.
    - b. Extraire et quantifier l'ARN des cellules traitées aux différentes conditions.
    - c. Envoyer l'ARN extrait à Génome Québec pour qu'ils soient testés sur des biopuces d'ADN.
    - d. Analyser les résultats obtenus et déterminer quels ARNm ont été modulés par rapport au contrôle et qui seront plus en détail pour la suite des travaux.

### **Structure du mémoire**

Dans ce mémoire, vous trouverez d'abord une revue de la littérature sur l'Achillée millefeuille et la Brasénie de Schreber (Chapitre 1). Par la suite, se trouve un article scientifique sur l'Achillée millefeuille (Chapitre 2), et d'un second article sur la Brasénie de Schreber (Chapitre 3). Il y a ensuite un chapitre sur les travaux effectués jusqu'à maintenant sur l'effet génomique de la Brasénie de Schreber sur des fibroblastes de peau humaine (Chapitre 4). Pour terminer, il y a une conclusion et les perspectives dégagées de ce projet de maîtrise.

## CHAPITRE 1

### REVUE DE LITTÉRATURE

#### 1.1 Achillée millefeuille

##### 1.1.1 Description de la plante

*Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* (Larivière 2007), *Achillea millefolium*, L. (Gleason et Cronquist 1991; Frère Marie-Victorin *et al.* 2002; Daigle et Daigle 2003b), Achillée millefeuille, Herbe à dindes, Common yarrow et Field hop (Duke 1985) sont quelques noms donnés à cette plante parmi tant d'autres. Son nom latin *Achillea* provient d'Achille, un guerrier dans la mythologie grecque, qui l'utilisait pour soigner les blessures (Lacoursière et Therrien 1998; Larivière 2007), alors que *millefolium* vient du fait que ses feuilles sont très découpées donnant l'illusion qu'elle possède mille feuilles (Lacoursière et Therrien 1998). Par ailleurs, le nom Herbe à dindes rappelle qu'autrefois les dindes étaient nourries avec cette plante (Lacoursière et Therrien 1998; Larivière 2007). L'Achillée millefeuille est une plante herbacée faisant partie de la famille des Astéracées (Duke 1985; Gleason et Cronquist 1991; Larivière 2007). Elle fleurit durant la saison estivale et ses fleurs sont de couleur blanche à rosée (Daigle et Daigle 2003b; Larivière 2007).

Cette plante est principalement répandue en Amérique du Nord, en Europe et en Asie (Harris *et al.* 2006; Ali *et al.* 2017). Elle possède 20 sous-espèces très variables au niveau de la ploïdie et de la morphologie (Benedek *et al.* 2007b). On la retrouve dans les pâturages, les prairies, les bois, le bord de la route et des ruisseaux en terrain usé et dans les champs. Elle pousse sur le sol sec ou sableux, sol humide, argileux et salé. (Harris *et al.* 2006) Puisqu'elle est polyploïde et qu'elle peut vivre dans différentes conditions, il n'est guère surprenant d'observer beaucoup de variabilité au niveau de sa morphologie et de sa composition chimique (Harris *et al.* 2006; Benedek *et al.* 2007b).

### 1.1.2 Usages traditionnels

Cette plante se retrouve dans la médecine traditionnelle de plusieurs cultures à travers le monde. En fait, elle était utilisée pour traiter divers problèmes de santé tels que les problèmes gastro-intestinaux (Europe, Iran, Italie, Pérou, Brésil, Inde (Ali *et al.* 2017)), respiratoires (Amérique du Nord (Moerman 2003), Grande-Bretagne et Irlande (Ali *et al.* 2017)) et cutanés (Amérique du Nord (Moerman 2003), Grande-Bretagne et Irlande, Europe, Pérou, Brésil, Chine (Ali *et al.* 2017)).

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons seulement nous attarder aux usages de l'Achillée millefeuille sur la peau (voir Tableau 1). L'Achillée millefeuille a été utilisée pour traiter divers problèmes dermatologiques tels que dans les traitements d'abcès, d'irritations cutanées, d'inflammations, de blessures et d'infections cutanées (Miraldi *et al.* 2001; Moerman 2003; Allen et Hatfield 2004; Bussmann *et al.* 2007; Jaric *et al.* 2007; Kultur 2007; Ugulu et Baslar 2010; Applequist et Moerman 2011; Ali *et al.* 2017). Ces différents usages traditionnels peuvent en partie expliquer l'intérêt d'étudier plus en profondeur les activités biologiques de l'Achillée millefeuille.

**Tableau 1 : Usages topiques de l'Achillée millefeuille à travers le monde**

Usage topique	Nation	Références
Traiter les furoncles	Amérique du Nord (Bella Coola, Crow et Shoshoni)	Moerman (2003)
Traiter les plaies	Amérique du Nord (Blackfoot, Klallam, Kutenai, Kwakiult, Lakota, Menominee, Paiute, Squaxin, Thompson, Pomo Kashaya, Costanoan, Great Basin Indian, Navajo, Shoshoni, Washo)	Moerman (2003)
Traiter les enflures et l'inflammation de la peau	Amérique du Nord (Carrier, Kwakiult, Menominee, Paiute, Winnebago, Shoshoni, Washo)	Moerman (2003)
	Europe	Ali <i>et al.</i> (2017)
	Iran	Miraldi <i>et al.</i> (2001)
Traiter les hémorragies	Amérique du Nord (Cherokee)	Moerman (2003)
	Europe	Ali <i>et al.</i> (2017)
Traiter les problèmes intestinaux	Amérique du Nord (Cherokee)	Moerman (2003)
Appliquer aux éruptions cutanées	Amérique du Nord (Chippewa)	Moerman (2003)

Laver les cheveux	Amérique du Nord (Cowlitz, Okanagan-Colville)	Moerman (2003)
Traiter les plaies ouvertes	Amérique du Nord (Crow)	Moerman (2003)
Traiter les blessures	Amérique du Nord (Flathead, Karok, Kutenai, Lakota, Costanoan)	Moerman (2003)
	Europe	Ali <i>et al.</i> (2017)
	Hongrie	Applequist et Moerman (2011)
	Brésil	Ali <i>et al.</i> (2017)
	Grande-Bretagne et Irlande	Allen et Hatfield (2004)
	Chine	Applequist et Moerman (2011)
	Serbie	Jaric <i>et al.</i> (2007)
	Turquie	Kultur (2007); Ugulu et Baslar (2010)
Traiter les hématomes	Amérique du Nord (Gosiute, Malecite, Mendocino Indian, Micmac, Ute)	Moerman (2003)
Traiter les problèmes de peau	Amérique du Nord (Kutenai, Thompson)	Moerman (2003)
	Brésil	Ali <i>et al.</i> (2017)
Traiter l'exanthème	Amérique du Nord (Menominee, Thompson, Paiute, Shoshoni)	Moerman (2003)
Traiter l'eczéma	Amérique du Nord (Menominee)	Moerman (2003)
Utiliser comme nettoyant pour les mains gercées	Amérique du Nord (Okanagon, Thompson)	Moerman (2003)
Utiliser comme nettoyant pour les piqûres d'insectes	Amérique du Nord (Okanagon, Thompson)	Moerman (2003)
Utiliser comme nettoyant pour les boutons	Amérique du Nord (Okanagon, Thompson)	Moerman (2003)
Traiter les coupures	Amérique du Nord (Paiute, Thompson, Navajo)	Moerman (2003)
Traiter l'irritation causée par le sumac vénéneux	Amérique du Nord (Shuswap)	Moerman (2003)
Utiliser comme nettoyant	Amérique du Nord (Thompson)	Moerman (2003)
Utiliser comme nettoyant pour les endroits souffrants du corps	Amérique du Nord (Meskwaki)	Moerman (2003)
Appliquer sur des morsures d'araignées	Amérique du Nord (Ojibwa)	Moerman (2003)
Utiliser pour aider à extraire une écharde	Amérique du Nord (Shoshoni)	Moerman (2003)
Appliquer pour réduire la douleur afin d'ouvrir une blessure	Amérique du Nord (Shoshoni)	Moerman (2003)
Traiter les brûlures	Hongrie	Applequist et Moerman (2011)
Traiter les infections cutanées	Pérou	Bussmann <i>et al.</i> (2007)
Traiter les morsures de serpent	Chine	Applequist et Moerman (2011)
Traiter les ulcères	Serbie	Jaric <i>et al.</i> (2007)
Utiliser pour la cicatrisation de plaies	Europe sud-est	Jaric <i>et al.</i> (2007)

Utiliser sur les rides	Turquie	Ugulu et Baslar (2010)
Utiliser comme antiseptique pour nettoyer les plaies	Turquie	Kultur (2007)

### 1.1.3 Propriétés pharmacologiques

Puisque l'Achillée millefeuille se retrouve dans la médecine traditionnelle de plusieurs peuples à travers le monde, il n'est guère surprenant que plusieurs équipes de recherche se soient attardées à étudier ses propriétés biologiques pour tenter d'expliquer les usages traditionnels de la plante afin de l'incorporer à la médecine moderne. L'Achillée millefeuille possède entre autres des propriétés hépatoprotectrices (Gadgoli et Mishra 2007), antitumorales (Li *et al.* 2012c) et analgésiques (Nouredдини et Rasta 2008).

Le Tableau 2 présente les propriétés biologiques de l'Achillée millefeuille qui pourraient être intéressantes d'un point de vue dermatologique. Cette plante possède des propriétés anti-inflammatoires (Burk *et al.* 2010), antioxydantes (Keser *et al.* 2013), cicatrisantes (Sabet Jalali *et al.* 2007) et régénératrices de la peau (Pain *et al.* 2011). L'activité anti-inflammatoire de la plante s'explique en partie par la présence des flavonoïdes et d'acides dicaffeoylquiniques (DCQA) qui inhibent l'élastase neutrophile humaine et les métalloprotéinases matricielles 2 et 9, respectivement (Benedek *et al.* 2007a). Pour ce qui est de l'activité antioxydante de la plante, elle s'explique en partie par la présence d'acide caféique, d'acide néochlorogénique, d'acide férulique, de lutéoline, d'apigénine, de rutine, de lutéoline 7-O-glucoside et d'acide chlorogénique (Wojdylo *et al.* 2007; Vitalini *et al.* 2011).

L'huile essentielle de l'Achillée millefeuille possède des propriétés anti-inflammatoires (Chou *et al.* 2013), antioxydantes (Chou *et al.* 2013), antifongiques (Falconeri *et al.* 2011), antibactériennes (Mazandarani *et al.* 2012) et anti-mélanogénèse (Peng *et al.* 2014). L'activité antioxydante de l'huile essentielle est en partie due à sa teneur en carvacrol, thymol, bornéol, camphre, eucalyptol,  $\alpha$ -pinène et  $\beta$ -terpinol (Candan *et al.* 2003; Kazemi 2015).

**Tableau 2 : Propriétés biologiques de l'Achillée millefeuille pour la peau**

<b>Propriétés</b>	<b>Type d'extrait</b>	<b>Références</b>
Anti-inflammatoire	Huile essentielle des parties aériennes provenant de Serbie	Tadic <i>et al.</i> (2017)
	Huile essentielle provenant d'Australie	Chou <i>et al.</i> (2013)
	Extrait aqueux des inflorescences provenant de Bulgarie	Burk <i>et al.</i> (2010)
	Extrait méthanolique 20 % des parties aériennes provenant d'Italie	Benedek <i>et al.</i> (2007a)
	Extrait méthanolique des parties aériennes provenant d'Iran	Yassa <i>et al.</i> (2007)
	Huile essentielle des feuilles provenant du Brésil	Lopes <i>et al.</i> (2005)
	Fraction hydrosoluble d'un extrait de chloroforme de fleurs provenant du New Jersey	Goldberg <i>et al.</i> (1969)
Antioxydante	Huile essentielle des parties aériennes	Kazemi (2015)
	Extrait éthanolique des fleurs et extrait aqueux des graines provenant de Turquie	Keser <i>et al.</i> (2013)
	Huile essentielle de la plante provenant d'Australie	Chou <i>et al.</i> (2013)
	Extrait méthanolique des parties aériennes provenant d'Italie	Vitalini <i>et al.</i> (2011)
	Extraits éthanolique 50 % des parties aériennes provenant de France	Fraisse <i>et al.</i> (2011)
	Extrait méthanolique 20 % de la plante provenant de Pologne	Wojdylo <i>et al.</i> (2007)
	Huile essentielle Turquie	Candan <i>et al.</i> (2003)
Antimicrobienne	Huile essentielle des parties aériennes provenant d'Italie et du Portugal	Falconeri <i>et al.</i> (2011)
	Huile essentielle des parties aériennes en fleurs provenant d'Iran	Mazandarani <i>et al.</i> (2012)
	Huile essentielle et extrait méthanolique de la plante provenant de Turquie	Candan <i>et al.</i> (2003)
	Extrait hexane: éther: méthanol des parties aériennes provenant de la Serbie	Stojanovic <i>et al.</i> (2005)
	Extrait éthanolique 80 % de plant provenant de Russie	Kokoska <i>et al.</i> (2002)
Régénération de la peau	Non précisé	Pain <i>et al.</i> (2011)
Anti-mélanogénèse	Huile essentielle provenant d'Australie	Peng <i>et al.</i> (2014)
Cicatrisante	Extrait aqueux des parties aériennes provenant d'Iran	Sabet Jalali <i>et al.</i> (2007)
	Extrait éthanolique 80 % des feuilles provenant d'Iran	Ghobadian <i>et al.</i> (2015)



## 1.2 Brasénie de Schreber

### 1.2.1 Description de la plante

La Brasénie de Schreber est connue sous plusieurs noms : *Brasenia schreberi* J.F. Gmel., Watershield et Watershield (Daigle et Daigle 2003a; Brandenburg 2010). Elle fait partie de la famille des Cabombacées qui est une famille de plantes herbacées aquatiques ayant de grandes feuilles enracinées dans la vase (Marie-Victorin et al. 2002).

Cette plante aquatique est retrouvée dans les étangs et lacs principalement en Amérique (Frère Marie-Victorin et al. 2002; Daigle et Daigle 2003a; Tiner 2009). On la retrouve également par stations isolées à travers le monde tels qu'au sud-ouest de l'Afrique, à l'est de l'Australie, en Inde, au Japon et en Mandchourie (Frère Marie-Victorin et al. 2002). Toutes les parties submergées de la plante sont recouvertes d'une substance gélatineuse constituée de polysaccharides : les mucilages (Crow et Hellquist 2000; Frère Marie-Victorin et al. 2002). Seulement, l'envers de ses feuilles flottantes n'est pas recouvert de mucilages (Daigle et Daigle 2003a; Brandenburg 2010). Ses fleurs sont de pourpre à marrons (Daigle et Daigle 2003a; Brandenburg 2010).

### 1.2.2 Usages traditionnels

Les Autochtones d'Amérique du Nord auraient utilisé les racines broyées en farine de la Brasénie de Schreber pour s'alimenter (Les 2017). La Brasénie de Schreber a principalement été utilisée traditionnellement en Asie comme le montre le Tableau 3. Les jeunes feuilles, les tiges et les bourgeons se retrouvent dans certains mets de la cuisine chinoise et japonaise (Misaki et Smith 1962; Li et al. 2007). Les jeunes feuilles sont considérées comme un légume de haute valeur nutritionnelle et médicinale (Hong et Blackmore 2015). Cette plante est cultivée depuis plus de 2000 ans en Chine (Hong et Blackmore 2015). On retrouve cette plante notamment dans la médecine traditionnelle chinoise pour traiter différents problèmes de santé tels que la dysenterie, la jaunisse, l'inflammation et la tuberculose (Zhou et al. 2011; Bolotova 2015).

**Tableau 3 : Usages traditionnels de la Brasénie de Schreber**

Usage	Nation	Références
Nutraceutique	Chine	Li <i>et al.</i> (2007)
	Japon	Misaki et Smith (1962)
	Amérique du Nord	Les (2017)
Améliorer les sécrétions gastriques	Chine	Li <i>et al.</i> (2007)
Prévenir l'apparition de lésions au foie	Chine	Li <i>et al.</i> (2007)
Guérir la dysenterie causée par la chaleur	Chine	Les (2017); Li <i>et al.</i> (2007); Zhou <i>et al.</i> (2011)
Traiter la jaunisse	Chine	Li <i>et al.</i> (2007); Zhou <i>et al.</i> (2011)
Traiter l'inflammation	Chine	Li <i>et al.</i> (2007); Zhou <i>et al.</i> (2011)
Traiter la douleur	Chine	Li <i>et al.</i> (2007)
Traiter les furoncles	Chine	Li <i>et al.</i> (2007)
Prévenir le cancer	Chine	Li <i>et al.</i> (2007)
Utiliser comme tonique	Chine	Bolotova (2015)
Utiliser comme astringent	Chine	Bolotova (2015); Les (2017)
Utiliser pour le traitement des maladies respiratoires	Chine	Bolotova (2015)
Utiliser pour le traitement de la tuberculose	Chine	Bolotova (2015); Les (2017)
Utiliser pour le traitement de problèmes au niveau du système génito-urinaire	Chine	Zhou <i>et al.</i> (2011); Bolotova (2015)
Traiter les abcès	Chine	Zhou <i>et al.</i> (2011)

### 1.2.3 Propriétés pharmacologiques

La Brasénie de Schreber possède de nombreuses propriétés intéressantes comme le montre le Tableau 4. La plante possède des propriétés anti-VIH (virus de l'immunodéficience humaine) grâce à l'inhibition de l'activité ADN polymérase et ARNase H de la transcriptase inverse du VIH-1 ainsi qu'à l'inhibition de la réplication du VIH-1 (Hisayoshi *et al.* 2014; Hisayoshi *et al.* 2015). Puisque les mucilages qui recouvrent la Brasénie de Schreber possèdent des propriétés lubrifiantes, son utilisation pour l'enrobage de comprimés est un bon moyen de faciliter la déglutition (Li *et al.* 2012a; Les 2017). Les mucilages de la Brasénie possèdent également des propriétés hypocholestérolémiantes; lors d'une étude *in vivo* chez des rongeurs traités pendant 3 semaines avec les mucilages, une diminution significative du taux de cholestérol total du plasma a été observée (Kim *et al.* 2014).

**Tableau 4 : Propriétés de la Brasénie de Schreber**

Activité étudiée	Extrait	Références
Antibactérienne	Fractions d'un extrait méthanolique	Elakovich et Wooten (1987)
Anti-algue	Extrait méthanolique	Elakovich et Wooten (1987)
Allélopathique	Extrait d'acétone	Elakovich et Wooten (1987)
Hypoglycémique	Fractions de polysaccharides du mucilage de la plante	Feng <i>et al.</i> (2019)
Anti-VIH	Extraits aqueux et éthanolique	Hisayoshi <i>et al.</i> (2014)
	Extraits aqueux et éthanolique	Hisayoshi <i>et al.</i> (2015)
Hypocholestérolémiant	2% de mucilage	Kim <i>et al.</i> (2014)
Antioxydante	Extraits méthanolique et aqueux	Legault <i>et al.</i> (2011)
	Fractions de polysaccharides hydrosolubles du mucilage	Xiao <i>et al.</i> (2016)
Anti-inflammatoire	7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de quercétine provenant d'un extrait méthanolique	Legault <i>et al.</i> (2011)
Lubrifiante	Mucilage	Li <i>et al.</i> (2012a)
	Mucilage	Liu <i>et al.</i> (2014)
Anti-hyperlipidémique	Extraits éthanolique et aqueux	Takahashi <i>et al.</i> (2011)
Purification de l'eau usée	La plante vivante	Xiang <i>et al.</i> (2018)

La Brasénie de Schreber possède également des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires (Legault *et al.* 2011; Xiao *et al.* 2016). Les propriétés antioxydantes des feuilles de la Brasénie sont en partie dues à la présence de la 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de quercétine et de l'acide gallique dans des extraits méthanolique et aqueux, respectivement (Legault *et al.* 2011). Les mucilages de la Brasénie ont également des propriétés antioxydantes qui seraient dues à la présence de radicaux sulfuriques et de l'acide uronique (Xiao *et al.* 2016). Quant aux propriétés anti-inflammatoires de la plante, c'est la présence de la 7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside de quercétine dans les feuilles de la Brasénie qui inhibe l'expression de facteurs impliqués dans l'inflammation : l'oxyde nitrique synthase inducible (iNOS), la cyclooxygénase-2 (COX-2) et le facteur de stimulation des colonies granulocytes-macrophages (GM-CSF) ainsi que la relâche d'oxyde nitrique (NO) par les macrophages (Legault *et al.* 2011).

## CHAPITRE 2

### COMPARAISON DU POTENTIEL COSMÉCEUTIQUE DE L'ACHILLÉE MILLEFEUILLE CULTIVÉE À CELLE SAUVAGE DU SAGUENAY-LAC-SAINT-JEAN, QUÉBEC, CANADA

#### 2.1 Résumé

Le vieillissement cutané résulte de l'incapacité de la peau à réparer de manière efficace les dommages cellulaires causés par les stress internes et externes. Le stress oxydatif et l'inflammation jouent des rôles importants dans le processus du vieillissement cutané et peuvent altérer le fonctionnement d'une variété de macromolécules présentes dans la peau ainsi que contribuer à la détérioration de la matrice extracellulaire. Puisque les consommateurs recherchent des produits plus naturels, l'industrie cosmétique s'adapte à sa clientèle en utilisant des ingrédients tels que des extraits de plantes. L'Achillée millefeuille est une plante médicinale avec des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. Cultiver l'Achillée millefeuille pour usage cosmétique pourrait éviter de mettre de la pression sur l'espèce sauvage et également de limiter la variabilité de l'activité biologique de la plante entre chaque lot. Cependant, peu d'études comparent l'activité biologique d'extraits d'Achillée millefeuille cultivée à celle d'extraits de plantes sauvages. Le but de cette étude est donc de réaliser un criblage préliminaire des activités antioxydantes et anti-inflammatoires d'extraits de plantes sauvages et cultivées, afin de sélectionner l'extrait ayant le meilleur potentiel anti-âge pour le développement de produits cosmétiques naturels. Tous les extraits testés possèdent des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. L'extrait le plus prometteur est l'extrait éthanolique de feuilles cultivées, car bien qu'il soit toxique à de hautes concentrations ( $IC_{20}$  de  $77 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ ) sur des cultures *in vitro* de fibroblastes humains, cet extrait présente des activités antioxydantes et anti-inflammatoires à de très faibles concentrations, soit des  $IC_{50}$  de  $0,22 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$  et  $29 \pm 7 \mu\text{g/mL}$  respectivement. Cet extrait est deux fois plus antioxydant et 3,8 fois plus anti-inflammatoire que l'extrait éthanolique de feuilles sauvages. Cette différence pourrait être expliquée par une différence au niveau de la teneur en acide chlorogénique, un composé ayant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires. L'extrait

éthanolique de feuilles cultivées contient 1,4 fois plus d'acide chlorogénique que l'extrait de feuilles sauvages. Pour ce qui est des huiles essentielles de l'Achillée millefeuille, il est intéressant de noter que la plante cultivée ne produit pratiquement pas d'huile essentielle, tandis que la plante sauvage a un rendement de 0,0918% en huile essentielle. L'huile essentielle de la plante sauvage a des propriétés antioxydantes ( $IC_{50}$  de  $0,19 \pm 0,03$  % (v/v)), anti-inflammatoires ( $IC_{50}$  de  $0,010 \pm 0,001$  % (v/v)) et antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* ( $MIC_{90}$  de  $2,9 \pm 0,5$  % (v/v)). L'extrait éthanolique des feuilles cultivées ainsi que l'huile essentielle de la plante sauvage pourraient présenter des propriétés anti-âge intéressantes.

**COMPARISON OF WILD AND CULTIVATED *ACHILLEA MILLEFOLIUM* FROM THE SAGUENAY-LAC-ST-JEAN REGION (QUEBEC, CANADA) FOR COSMETIC USE**

Jessica Fortin-Mimeault<sup>1</sup>, André Pichette<sup>1</sup>, Jean Legault<sup>1</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Centre de recherche sur la boréale (CREB), Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE), Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi (Québec), Canada.

**Address for reprint requests:**

Jean Legault, Ph.D. (Corresponding author)

Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)

555 Boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7H 2B1

Tel : (1) 418-545-5011 ext. 2334

Fax: +1 418 545 5012

E-mail : Jean.Legault@uqac.ca

## 2.2 Abstract

Skin ageing results in the skin's inability to effectively repair cellular damages caused by internal and external stresses. Oxidative stress and inflammation play essential roles in the skin ageing process, including deteriorating the extracellular matrix and altering various macromolecules present in the skin. Because consumers want more natural products, the cosmetic industry uses more natural ingredients such as plant extracts. *Achillea millefolium* is a medicinal plant with antioxidant and anti-inflammatory properties. Cultivating *Achillea millefolium* for cosmetic purposes could help reduce the pressure on the wild species and limit the variability in the plant's biological activity between batches. However, few studies have compared the biological activities of cultivated *Achillea millefolium* extracts to the wild extracts. Therefore, this study aimed to conduct a preliminary screening of the antioxidant and anti-inflammatory effects of wild and cultivated *Achillea millefolium* extracts to select a potential anti-ageing extract to develop natural cosmetic products. All the extracts obtained had antioxidant and anti-inflammatory activities. Although it presents toxicity at high concentrations ( $IC_{20}$  of  $77 \pm 11 \mu\text{g/mL}$ ) on *in vitro* human fibroblast cultures, the most promising extract was the cultivated leaf ethanol extract. It has antioxidant and anti-inflammatory properties at lower levels ( $IC_{50}$  of  $0.22 \pm 0.01 \mu\text{g/mL}$  and  $29 \pm 7 \mu\text{g/mL}$ , respectively). This extract has twice the antioxidant and 3.8 times the anti-inflammatory properties of the wild leaf ethanol extract. This difference could be explained, in part, by a difference in chlorogenic acid content, a compound with antioxidant and anti-inflammatory properties. Indeed, the cultivated leaf ethanol extract contains 1.4 times more chlorogenic acid than its wild counterpart. As for the *Achillea millefolium* essential oils, it is interesting to note that the cultivated plant produces trace amounts of essential oil, while the wild plant has a yield of 0.0918%. The wild essential oil possesses antioxidant ( $IC_{50}$  of  $0.19 \pm 0.03\%$  (v/v)), anti-inflammatory ( $IC_{50}$  of  $0.010 \pm 0.001\%$  (v/v)) and antibacterial ( $MIC_{90}$  of  $2.9 \pm 0.5\%$  (v/v) for *Staphylococcus aureus*) activities. Both the cultivated leaf ethanol extract and the wild essential oil have interesting anti-ageing properties.

### 2.3 Introduction

Skin, the largest organ of the human body, is the most noticeable organ that reflects our age (Tobin 2006; Farage *et al.* 2013). It protects us daily from external factors present in our environments such as microorganisms, temperature changes and ultraviolet (UV) radiation (Venus *et al.* 2011). As we grow old, our skin functions are altered; reduced sweat production, increased itching sensation and decreased skin resistance and elasticity are a few of the visible changes that occur (Farage *et al.* 2007). These changes in the ageing skin result in its inability to effectively repair cellular damages caused by environmental and internal stresses (Labunskyy and Gladyshev 2013). Both oxidative stress and inflammation play essential roles in the ageing process and are interdependent (Zhuang and Lyga 2014; Rinnerthaler *et al.* 2015; Biswas 2016). Together, they can deteriorate the extracellular matrix and alter various macromolecules, including proteins, lipids and nucleic acids (Zhuang and Lyga 2014; Rinnerthaler *et al.* 2015).

Using natural ingredients has been on the rise in cosmetic products for quite some time due to consumers becoming more environmentally and health-conscious (Amberg and Fogarassy 2019). Plants are sources of natural compounds that can possess pharmacological properties attractive to the cosmetic industry, such as antioxidant and anti-inflammatory effects (Borges *et al.* 2017).

*Achillea millefolium*, a plant in the family of Asteraceae (Frère Marie-Victorin *et al.* 2002), has been used throughout history to treat different disorders by nations worldwide. Indeed, this plant can be found in Chinese medicine to treat wounds, snake bites and tuberculosis (Ali *et al.* 2017). It was used in Europe to treat pain, inflammation, and injuries (Ali *et al.* 2017). *A. millefolium* was also used by many tribes of Native Americans against pain, fever, swelling and wounds, to name a few traditional uses (Moerman 2003). This plant possesses anti-inflammatory and antioxidant effects (Ali *et al.* 2017). These activities make *A. millefolium* quite an attractive plant for the cosmetic industry.

Cultivation could help reduce pressure on the species and limit the plant's biological activity variability between each production lot (Lubbe and Verpoorte 2011). Few studies have compared



cultivated *A. millefolium* plants to their wild counterparts (Agnihotri *et al.* 2005). To our knowledge, there have, however, not been any published studies that compare the biological activities of cultivated *A. millefolium* plant extracts to the wild plant extracts. Therefore, this study aimed to screen the antioxidant and anti-inflammatory effects of extracts from wild and cultivated plant material to select a potential anti-ageing extract to develop natural cosmetic products.

## **2.4 Materials and methods**

### **2.4.1 Plant material**

The flowering aerial parts of cultivated *A. millefolium* were collected from a field in Canton-Tremblay, Quebec. As for the wild *A. millefolium*, it was harvested from a meadow in St-Fulgence, Quebec. Both the wild and cultivated plants were collected in July. The plants were authenticated by Mr. Patrick Nadeau (Université du Québec à Chicoutimi), and voucher specimens (No. 623152 (wild) and No. 623153 (cultivated)) was deposited at the Louis-Marie Herbarium of Université Laval, Quebec City, Quebec, Canada. After collection, plants were air-dried for two weeks before extraction unless mentioned otherwise.

### **2.4.2 Preparation of essential oils and solvent extracts**

The *A. millefolium* essential oil was obtained by the steam distillation of 500 g of fresh aerial parts in water for 4 hours. The extracts were obtained by maceration: 25 g of ground dried plant material in 500 mL of solvent for 16 hours. The leaves and the flowers were macerated separately with five different solvents: methanol (MeOH), ethanol (EtOH), EtOH:H<sub>2</sub>O (3:1), EtOH:H<sub>2</sub>O (1:1) and water. Solvent extracts were then filtered and were either evaporated or lyophilized until a dry extract was obtained.

#### 2.4.3 Thin-layer chromatography (TLC) conditions

Silicycle supplied the thin-layer chromatography (TLC) plates (silica gel ultrapure 250  $\mu$ m, F254). The TLC mobile phase was  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O:HCOOH (50:15:1:0.1). Phenolic compounds were detected by spraying 2-aminoethyl-diphenylborinate with polyethylene glycol (NP/PEG) reagent and observing them under ultraviolet light (365 and 254 nm). Triterpene compounds were detected using a 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in MeOH spray reagent followed by 5 minutes at 100°C and observing them under visible light and 365 nm.

#### 2.4.4 High-performance liquid chromatography coupled with a mass spectrometer (HPLC-MS) conditions

HPLC analyses were carried out with an Agilent system consisting of a serie 1200 degasser (G1379B), a serie 1100 pump with a solvent cabinet (G1310A), a serie 1200 automatic injector, a serie 1100 temperature-controlled column compartment (G1316A), a serie 1100 diode array detector (G1315B) and a mass selective detector Agilent serie 1100 (G1956B) model equipped with an APCI source. A Phenomenex kinetex 5 $\mu$ m Biphenyl 100Å column (250 x 4.6 mm) was used to separate the different compounds contained in the samples. An injection volume of 10  $\mu$ L of the sample and standards dissolved in MeOH (10 mg/mL and 0.5 mg/mL, respectively) was used. Flow rate was 1 mL/min and a gradient method of 10 % to 100 % MeOH with 0.1 % HCOOH in H<sub>2</sub>O with 0.1 % HCOOH for 30 min. Between each sample, there was a 10 min period of washing with 100 % MeOH with 0.1 % HCOOH. MS spectra of purified compounds were obtained with the MM-ES + APCI multimode ionization and negative polarity. The standards used were chlorogenic acid, rutin, luteolin and apigenin.

#### 2.4.5 Gas chromatography coupled with a mass spectrometer (GC-MS) conditions

GC-MS analysis were carried out on an Agilent GC-MS comprising a 7890A GC system fitted with a split/splitless inlet, a GC sampler 80, and a 5975C MSD (EI mode 70 eV). Separations were performed on an Agilent HP-5 capillary column (30 m x 0.320 mm di x 0.25  $\mu$ m film thickness). The

carrier gas was helium with a flowthrough of 1 mL/min. The temperature was set at 60°C and held for 2 min, then 60°C to 250°C at a rate of 3°C/min, 250°C to 280°C at a rate of 15°C/min and 280°C to 100°C at a rate of 45°C/min. Injections were performed in split mode with an 800:1 ratio. Compounds were identified by their retention index, mass spectra using Wiley 6n, HPCH2205, FFSNC and NIST148 database.

#### 2.4.6 Gas chromatography coupled with flame ionization detector (GC-FID) conditions

GC-FID analysis were carried out on an Agilent 7890A GC-FID system fitted with a split/splitless inlet and an automatic liquid sampler. Separations were performed on the same capillary column using the same method as GC-MS analysis. Compounds were identified from their retention indexes as calculated from C7 to C40 alkane (0.2 mg/mL in hexane; Sigma-Aldrich). Quantification was derived from the FID detector response on the HP-5 column without any correction factor.

#### 2.4.7 Cell culture

Human skin fibroblasts WS-1 (ATCC CRL-1502) and murine macrophage RAW 264.7 (ATCC TIB-71) were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Cells were grown in a humidified atmosphere at 37°C and 5 % CO<sub>2</sub>, in Dulbecco's Minimum Essential Medium supplemented with 10 % fetal calf serum (Hyclone, Logan, UT, USA), 1x MEM Vitamins (Corning, Manassas, VA, USA), 100 IU of penicillin and 100 µg/mL streptomycin (Cellgro®, Mediatech, Manassas, VA, USA). The complete medium was refreshed twice a week. Cells were frozen in liquid nitrogen until needed for the following experiments.

#### 2.4.8 Preparation of the tested samples

Stock solutions of extracts were prepared in DMSO and stored at -20°C until needed. The DMSO final concentration in the culture medium was maintained at 0.5 % (v/v) to avoid solvent toxicity

for all the assays on cells. The concentrations tested for the extracts ranged from 0 to 200 µg/mL. The essential oil was diluted in DMSO for most assays (MeOH for the antibacterial assay). The concentration tested for the essential oil ranged from 0 to 0.3 % (v/v).

#### 2.4.9 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

The assay was performed as described by Ou *et al.* (2001) with modifications. This test measures the capacity of the extracts to neutralize peroxy radicals. First, dilutions of the samples and the internal standards, quercetin and trolox (both tested at 1.25 mg/mL and 5 mg/mL), were prepared and transferred in a black flat-bottom 384-wells (Greiner Bio-One). Afterwards, the fluorochrome was added. The kinetic started when the oxidant, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), was added. The plate was then read by the Fluoroskan Ascent FLTM plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) (excitation: 485 nm; emission: 538 nm) for an hour. If a sample were antioxidant, it would slow down the fluorochrome's oxidation, which, once oxidized, loses its fluorescence. So, a potent antioxidant gives slower kinetics of loss of fluorescence (Ou *et al.* 2001). The final results were calculated by comparing the net areas under the fluorescein decay curves between the blank and the samples. ORAC values were expressed in micromoles of trolox equivalents (TE) per milligram (µmol TE/mg) for the extracts and in µmol TE per millilitre (µmol TE/mL) for the essential oil.

#### 2.4.10 Cellular antioxidant assay

The procedure was performed as described by Girard-Lalancette *et al.* (2009). Briefly, to determine the sample's antioxidant potential, human skin fibroblasts WS-1 were seeded into a 96-well plate ( $1 \times 10^4$  cells per well) and incubated at 37°C; 5 % CO<sub>2</sub> for 24 hours. The cells were rinsed with 150 µL of phosphate buffer saline (PBS) before incubating for 30 min with 100 µL of 5 µM 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) in Hanks' balanced salt solution (HBSS). Afterwards, the cells were rinsed again with PBS and incubated for one hour with the different concentrations of the tested extracts, essential oil and the positive standard, quercetin (levels tested ranged from 0 to 6.25 µg/mL).

Then, for the oxidative stress, 200  $\mu$ M tert-butyl hydroperoxide (t-BuOOH) was added, and the fluorescence was monitored directly after the administration of the t-BuOOH and after two hours. Measurements were performed with a plate reader (Fluoroskan Ascent FLTM, Labsystems, Milford, MA, USA) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Antioxidant activity was expressed as the concentration of extract inhibiting 50 % (IC<sub>50</sub>) of DCFH oxidation (Girard-Lalancette *et al.* 2009). If a sample were antioxidant, it should be oxidized instead of the DCFH-DA. Indeed, the more a sample is antioxidant, the more the fluorochrome is protected from oxidation resulting in less important fluorescence detection. So, the more fluorescence detected, the less the sample has antioxidant properties.

#### 2.4.11 Anti-inflammatory assay

The assay was performed as described previously by Legault *et al.* (2011). Briefly, this test measures nitric oxide (NO) produced by the macrophages RAW 264.7 in the presence of *Escherichia coli* lipopolysaccharides (LPS). The macrophages were seeded into a 96-well plate ( $7.5 \times 10^4$  cells per well) and incubated for 16 hours. Afterwards, cells were treated with extracts or the essential oil dissolved in DMSO at different concentrations or the positive control, N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (levels tested were 250  $\mu$ M and 1 mM), and then incubated for 24 hours. Cells were treated with LPS (100 ng/mL) to stimulate the release of NO and incubated for 24 hours. After that, 100  $\mu$ L of cell supernatant was mixed with 100  $\mu$ L of Griess reagent, prepared as described by Green *et al.* (1990), and incubated at room temperature and shielded from the light for 20 min. Nitrite quantification was estimated using a NaNO<sub>2</sub> standard curve, and the absorbance was read at 540 nm using a Multiskan GO plate reader (Thermo Electron).

#### 2.4.12 Cytotoxic assay

The test performed was previously described by Legault *et al.* (2011). Briefly, WS-1 cells were plated in flat-bottom 96-well plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well in 100  $\mu$ L of culture medium

and to adhere for 24 hours before treatment. Increasing concentrations of the extracts, the essential oil or of the positive control, Etoposide (concentrations tested ranged from 0 to 50  $\mu\text{M}$ ), were then added (100  $\mu\text{L}$  per well). The cells were incubated for 48 hours in the presence or absence of these samples. Then, cytotoxicity was assessed using the resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one10-oxide) reduction test (O'Brien *et al.* 2000). The fluorescence was measured on a Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) using excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. Cytotoxicity is expressed as the lowest concentration of tested extract inhibiting 20 % or more of cell growth in comparison to untreated cells. Following the resazurin test, the quantification of DNA was performed with the Hoechst 33342 staining dye solution. From each well, supernatants were removed, and a solution of SDS 0.01 % was added to break cell membranes. Then, the 96-well plates were frozen overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$  before adding a solution of Hoechst 30  $\mu\text{g/mL}$  (100  $\mu\text{L}$ ), which becomes fluorescent when it binds to the DNA (Data not shown). The fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 360 nm and 460 nm, respectively.  $\text{IC}_{20}$  was expressed as the concentration that inhibits 20 % of cellular growth.

#### 2.4.13 Antibacterial assay – Hydrophobic

The test was performed as described by Côté *et al.* (2016). Briefly, 100  $\mu\text{L}$  of Nutrient Broth Agar were distributed in 96-well plates and were kept at room temperature for one hour. A volume of MeOH (20  $\mu\text{L}$ ) containing growing concentrations of essential oil was spread on the Nutrient Broth Agar of 96-well plates. Plates were then were kept at room temperature for two hours or until the solvent was evaporated entirely. Bacterial strains (20  $\mu\text{L}$ ), including *E. coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), were added at a concentration of  $25 \times 10^4$  colony forming units (CFU)/mL in Nutrient Broth. Bacterial suspension without treatment was used as a negative control (where maximal growth was observed), and bacterial suspension plus solvent was tested in parallel to demonstrate the absence of solvent toxicity. Blank consisted of culture medium only and was subtracted from all subsequent measurements of every other well. 96-well plates were then incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for five

hours for bacterial growth. Then, 100 µL of resazurin sodium salt solution at 50 µg/mL (Sigma R-2127) was added to each well. After two hours for *S. aureus*, and three hours for *E. coli*, the fluorescence was read with a Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) using excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. MIC<sub>90</sub> was expressed as the lowest concentration inhibiting 90% of bacterial growth.

#### 2.4.14 Antibacterial assay – Broth microdilution assay

The assay was performed as described by Banfi *et al.* (2003) with modifications. Briefly, growing bacteria were plated in 96-well plates in 50 µL nutrient broth (Difco). The two bacterial strains used are *E. coli* and *S. aureus* at the concentration of  $5 \times 10^4$  and  $35 \times 10^4$  CFU/mL, respectively. Increasing levels of extracts (diluted in DMSO) were then added (100 µL), and microplates were incubated for 24 hours at 37°C. Absorbance was measured after 24 hours at 600 nm using a Multiskan GO plate reader (Thermo Electron).

#### 2.4.15 Statistical analysis

All the biological assays were carried out in triplicate in one independent experiment (N=1). The results are expressed as mean values and standard deviation.

## **2.5 Results**

### 2.5.1 *Achillea millefolium* leaf extracts

All the leaf extracts, whether wild or cultivated, contained triterpene saponins and flavonoids (Supplementary Figure 1). Both wild and cultivated leaf ethanol extracts' chemical composition was evaluated with HPLC-MS. The leaf extracts' chromatograms and the identified compounds' UV spectra can be found in the supplementary figures (Figure 3 and Figure 5). Both extracts contain chlorogenic acid, rutin and dicaffeoylquinic acids. The retention time and m/z of the identified compounds can be

found in the supplementary Table 10, and their chemical structure is shown in the supplementary Figure 4. The wild leaf ethanol extract contains 2.5 times more rutin than the cultivated leaf ethanol extract (supplementary Table 11). However, the cultivated leaf ethanol extract contains 1.4 times more chlorogenic acid than the wild leaf ethanol extract.

**Table 5 : Yield and biological activity screening of the different *A. millefolium* leaf extracts**

Place	Solvent	Yield (%)	Anti-inflammatory IC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>1</sup>	ORAC (μmol TE/mg) <sup>2</sup>	Cellular antioxidant IC <sub>50</sub> (μg/mL) <sup>3</sup>	Cytotoxicity IC <sub>20</sub> (μg/mL) <sup>4</sup>
Wild	MeOH	7.75	>160	2.4 ± 0.3	0.50 ± 0.09	>200
Wild	EtOH	4.00	111 ± 18	2.6 ± 0.6	0.44 ± 0.07	>200
Wild	EtOH:H <sub>2</sub> O (3:1)	15.11	>160	5.8 ± 0.9	0.18 ± 0.07	>200
Wild	EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	16.39	>160	4.4 ± 0.4	0.36 ± 0.06	>200
Wild	H <sub>2</sub> O	10.12	>160	0.6 ± 0.2	20 ± 7	>200
Cultivated	MeOH	7.68	80 ± 9	2.7 ± 0.4	0.6 ± 0.1	80 ± 14
Cultivated	EtOH	2.64	29 ± 7	2.9 ± 0.5	0.22 ± 0.01	77 ± 11
Cultivated	EtOH:H <sub>2</sub> O (3:1)	14.42	>160	2.6 ± 0.4	1.2 ± 0.1	>200
Cultivated	EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	14.35	>160	1.4 ± 0.2	0.86 ± 0.10	>200
Cultivated	H <sub>2</sub> O	11.16	>160	0.33 ± 0.08	18 ± 7	12 ± 8

All experiments were carried out in triplicate.

<sup>1</sup>L-NAME (1 mM), used as a positive anti-inflammatory control, produced a NO production inhibition of 68 %.

<sup>2</sup>Trolox, used as an ORAC positive control, had an ORAC value of 4.4 ± 0.7 μmol TE/mg.

<sup>3</sup>Quercetin, used as a positive antioxidant control, had an IC<sub>50</sub> of 0.064 ± 0.001 μg/mL.

<sup>4</sup>Etoposide, used as a positive cytotoxic control, had an IC<sub>20</sub> of 0.6 ± 0.1 μM

The obtained *A. millefolium* leaf extracts had yields between 2.6 and 16.4 % (Table 5). The ethanol macerations had the lowest yields, while the hydroethanolic extracts had the highest yields. Also, leaf extracts from wild *A. millefolium* seemed to have higher yields. As for the biological activities, both leaf ethanol extracts had an anti-inflammatory effect, but the cultivated leaf ethanol extract had the most potent activity with an IC<sub>50</sub> of 29 ± 7 μg/mL (Table 5). The leaf ethanolic extracts also presented some antioxidant activities. Still, the leaf extract with the most potent antioxidant effect was the wild leaf hydroethanolic (3:1) extract with a cellular antioxidant IC<sub>50</sub> of 0.18 ± 0.07 μg/mL and an ORAC of 5.8 ± 0.9 μmol TE/mg. Most leaf extracts did not present cytotoxicity at the highest concentration tested of 160 μg/mL. However, some of the cultivated leaf extracts exhibited cellular



toxicity at the tested concentrations. The cultivated leaf ethanol extract inhibited 20 % of cell growth at a concentration of 77 µg/mL. Interestingly, this extract's anti-inflammatory and antioxidant activities were present at lower concentrations than its toxicity. It has twice the antioxidant and 3.8 times the anti-inflammatory properties than the wild leaf ethanol extract. None of the leaf extracts tested had an antibacterial effect against *E. coli* and *S. aureus* at the highest concentration tested (200 µg/mL) (Data not shown).

#### 2.5.2 *Achillea millefolium* flower extracts

All flower extracts also contained compounds from the chemical families' triterpene saponins and flavonoids (Supplementary Figure 2). The chemical composition of both wild and cultivated flower ethanol extracts was evaluated with HPLC-MS. The flower extracts' chromatograms and the identified compounds' UV spectra can be found in the supplementary figures (Figure 3 and Figure 5). The retention time and m/z of the identified compounds in these extracts can be found in the supplementary Table 10, and their chemical structure is shown in the supplementary Figure 4. Both flower ethanol extracts contain chlorogenic acid, dicaffeoylquinic acids and apigenin (Table 11). While the wild flower ethanol extract contained rutin, the cultivated one contained luteolin. The wild flower ethanol extract also contained about twice the amount of chlorogenic acid compared to the cultivated flower extract.

The obtained flower extracts had yields between 5.2 and 21.3 % (Table 6). The flower extracts followed similar trends to the leaf extracts in yields. As for the biological activities, all flower extracts presented anti-inflammatory and antioxidant activities at the tested concentrations except for the water extracts (Table 6). Most of the extracts tested presented some cytotoxicity. The most potent anti-inflammatory extract was the cultivated flower ethanol extract with an IC<sub>50</sub> of 6.8 ± 0.7 µg/mL. This extract was also the one that presented the most cytotoxicity with an IC<sub>50</sub> of 13 ± 6 µg/mL. None of the flower extracts tested had an antibacterial effect (Data not shown).

**Table 6 : Yield and biological activity screening of the different *A. millefolium* flower extracts**

Place	Solvent	Yield (%)	Anti-inflammatory IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>1</sup>	ORAC (µmol Trolox/mg) <sup>2</sup>	Cellular antioxidant IC <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>3</sup>	Cytotoxicity IC <sub>20</sub> (µg/mL) <sup>4</sup>
Wild	MeOH	10.53	110 ± 6	3.1 ± 0.5	0.37 ± 0.04	110 ± 13
Wild	EtOH	7.87	57 ± 4	3.2 ± 0.5	0.65 ± 0.07	120 ± 16
Wild	EtOH:H <sub>2</sub> O (3:1)	16.72	117 ± 2	6 ± 1	0.40 ± 0.03	110 ± 80
Wild	EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	19.95	150 ± 6	2.6 ± 0.4	0.3 ± 0.1	>200
Wild	H <sub>2</sub> O	15.57	>160	0.52 ± 0.07	14 ± 5	>200
Cultivated	MeOH	9.87	14 ± 2	4.8 ± 0.7	0.85 ± 0.03	34 ± 5
Cultivated	EtOH	5.22	6.8 ± 0.7	3.1 ± 0.3	0.29 ± 0.01	13 ± 6
Cultivated	EtOH:H <sub>2</sub> O (3:1)	17.19	33 ± 7	2.9 ± 0.3	0.27 ± 0.03	57 ± 9
Cultivated	EtOH:H <sub>2</sub> O (1:1)	21.30	24 ± 3	2.8 ± 0.4	0.4 ± 0.1	41 ± 2
Cultivated	H <sub>2</sub> O	9.41	>160	0.43 ± 0.07	2.4 ± 0.3	>200

All experiments were carried out in triplicate.

<sup>1</sup>L-NAME (1 mM), used as a positive anti-inflammatory control, produced a NO production inhibition of 68 %.

<sup>2</sup>Trolox, used as an ORAC positive control, had an ORAC value of 4.4 ± 0.7 µmol TE/mg.

<sup>3</sup>Quercetin, used as a positive antioxidant control, had an IC<sub>50</sub> of 0.064 ± 0.001 µg/mL.

<sup>4</sup>Etoposide, used as a positive cytotoxic control, had an IC<sub>20</sub> of 0.6 ± 0.1 µM

### 2.5.3 *Achillea millefolium* essential oil

The wild essential oil was mainly composed of germacrene D, chamazulene and sabinene found in the proportion of 18.4 %, 12.9 % and 7.59 %, respectively (Table 7). Almost 90 % of the essential oil content was identified.

A yield of 0.092 % of the essential oil was obtained from the wild plant (Table 8). However, only trace amounts of essential oil were obtained by steam distillation for the cultivated plant. Unfortunately, it was not possible to determine the cultivated essential oil's chemical composition nor evaluate its biological activity due to an insufficient amount. The wild *A. millefolium* essential oil has IC<sub>50</sub> for antioxidant and anti-inflammatory at the concentrations of 0.19 ± 0.03 % (v/v) and 0.010 ± 0.001 % (v/v), respectively (Table 8). It was also not toxic at the highest concentrations tested on the WS-1. The wild essential oil was not active against *E. coli* at the highest concentration tested (5 % (v/v)) but was active against *S. aureus* with a MIC<sub>90</sub> of 2.9 ± 0.5 % (v/v).

**Table 7 : Identification of the chemical composition of the wild *A. millefolium* essential oil with GC-**

**MS**

<b>Compounds</b>	<b>RI</b>	<b>AI</b>	<b>Proportion (%)</b>
Tricyclene	931	921	0.119
$\alpha$ -Pinene	937	932	0.698
Camphene	953	946	0.998
Sabinene	979	969	7.59
$\beta$ -Pinene	983	974	3.87
Myrcene	997	988	5.55
$\alpha$ -Phellandrene	1010	1002	3.89
$\alpha$ -Terpinene	1022	1014	0.217
$p$ -Cymene	1031	1020	2.05
Limonene	1034	1024	0.982
1,8-Cineole	1045	1026	1.52
(E)- $\beta$ -Ocimene	1053	1044	0.103
$\gamma$ -Terpinene	1064	1054	1.34
Terpinolene	1095	1086	0.205
cis-Thujone	1121	1101	0.443
trans-Thujone	1131	1121	7.75
Camphor	1162	1141	3.29
Borneol	1182	1165	0.346
Terpinen-4-ol	1192	1174	0.348
$\alpha$ -Terpineol	1208	1186	0.191
Bornyl acetate	1302	1287	1.11
Caryophyllene	1428	1417	5.06
$\alpha$ -Humulene	1462	1452	0.736
(E)- $\beta$ -Farnesene	1466	1454	0.589
Germacrene D	1493	1484	18.4
Bicyclogermacrene	1506	1500	0.853
(E,E)- $\alpha$ -Farnesene	1517	1505	0.811
Cadinene $\delta$	1533	1522	0.680
(E)-Nerolidol	1602	1561	1.18
Caryophyllene oxide	1614	1582	1.36
cis-Guaia-3,9-dien-11-ol	1665	1648	0.538
Himachalol	1669	1652	0.724
$\alpha$ -Cadinol	1674	1652	1.11
Chamazulene	1750	1730	12.9
<b>Total</b>			<b>87.5</b>

**Table 8 : Yield and biological activity of *A. millefolium* essential oil**

Essential oil	Yield (%)	Anti-inflammatory IC <sub>50</sub> (% (v/v)) <sup>1</sup>	ORAC ( $\mu$ mol Trolox/mL) <sup>2</sup>	Cellular antioxidant IC <sub>50</sub> (% (v/v)) <sup>3</sup>	Cytotoxicity IC <sub>20</sub> (% (v/v)) <sup>4</sup>
Wild	0.092	0.010 $\pm$ 0.001	104 $\pm$ 30	0.19 $\pm$ 0.03	>0.125
Cultivated	Trace	-	-	-	-

All experiments were carried out in triplicate.

<sup>1</sup>L-NAME (1 mM), used as a positive anti-inflammatory control, produced a NO production inhibition of 68 %.

<sup>2</sup>Trolox, used as an ORAC positive control, had an ORAC value of 4.4  $\pm$  0.7  $\mu$ mol TE/mg.

<sup>3</sup>Quercetin, used as a positive antioxidant control, had an IC<sub>50</sub> of 0.064  $\pm$  0.001  $\mu$ g/mL.

<sup>4</sup>Etoposide, used as a positive cytotoxic control, had an IC<sub>20</sub> of 0.6  $\pm$  0.1  $\mu$ M

## 2.6 Discussion

Many studies over the past decades have shown that *A. millefolium* possesses quite a few pharmacological properties. Some of its most interesting anti-ageing effects are its anti-inflammatory and antioxidant properties (Ali *et al.* 2017). This study aimed to compare these biological activities in wild and cultivated plant extracts from the Saguenay-Lac-St-Jean region in Quebec, Canada. *A. millefolium* flower and leaf ethanol extracts presented the most potent anti-inflammatory activities. The cultivated ethanol extracts exhibited more potent cellular antioxidant and anti-inflammatory activities than wild ethanol extracts. However, the flower extracts displayed more cytotoxicity than the leaf extracts. Although the cultivated leaf ethanolic extract exhibited some toxicity compared to its wild counterpart, it was considered the most promising extract for cosmetic use. Its anti-inflammatory and antioxidant activities were present at lower concentrations than its cytotoxicity. The cultivated leaf ethanol extract has twice the antioxidant and 3.8 times the anti-inflammatory properties than the wild leaf ethanol extract. Unfortunately, the cultivated *A. millefolium* had only trace amounts of essential oil.

Because of their anti-inflammatory and antioxidant activities, the ethanolic extracts were chosen to investigate their chemical content further. All of the compounds identified in the ethanol extracts have also been found in *A. millefolium* by other researchers: chlorogenic acid, rutin, dicaffeoylquinic acids, luteolin and apigenin (Benedek *et al.* 2007a; Benetis *et al.* 2008). These

compounds can partly explain the potent antioxidant and anti-inflammatory effects obtained for the ethanolic extracts (Table 9). All of the compounds identified in the ethanolic extracts have previously been found to have anti-inflammatory activities, and all of them except dicaffeoylquinic acids have antioxidant properties. The differences observed in the extracts' toxicity and potency could be explained by the proportion of compounds and other unidentified compounds found in the extracts. For example, the difference in the strength of the ethanolic leaf extracts' anti-inflammatory and antioxidant activities could be due to their different chlorogenic acid content. The extract with the most potent anti-inflammatory and antioxidant activities, the cultivated leaf ethanol extract, contains 1.4 times more chlorogenic acid than its wild counterpart. It could be relevant in the future to compare the anti-inflammatory effects of the different compounds identified in these extracts to comprehend better their synergistic interaction (Gilbert and Ferreira Alves 2003). For example, luteolin and apigenin found in the cultivated flower ethanol extract could have a synergistic effect on the extract's anti-inflammatory activity. It could explain why the wild flower ethanol extract's anti-inflammatory activity is not as potent because it does not contain luteolin.

**Table 9 : Pharmacological effect of compounds identified in *A. millefolium* ethanolic extracts**

Compound	Effect	Reference
Apigenin	Anti-inflammatory	Man <i>et al.</i> (2012)
	Antioxidant	Sanchez-Marzo <i>et al.</i> (2019)
Chlorogenic acid	Anti-inflammatory	Shan <i>et al.</i> (2009)
	Antioxidant	Sato <i>et al.</i> (2011)
Dicaffeoylquinic acids	Anti-inflammatory	Benedek <i>et al.</i> (2007b)
Luteolin	Anti-inflammatory	Guo <i>et al.</i> (2017)
	Antioxidant	Guo <i>et al.</i> (2017)
Rutin	Anti-inflammatory	Choi <i>et al.</i> (2014)
	Antioxidant	Choi <i>et al.</i> (2016)

As for the wild *A. millefolium* essential oil, it seems to have anti-inflammatory and antioxidant activities. These properties have already been reported in an essential oil by Chou *et al.* (2013). Since there were insufficient amounts of essential oil to determine its density, the concentrations are

expressed in volume per volume and not in mass per volume, making it difficult to compare the values obtained with the literature. The wild *A. millefolium* essential oil was active against *S. aureus*. These results corroborate those found in the literature (Candan *et al.* 2003; Boucher 2015). However, Boucher (2015) also found that *A. millefolium* essential oil from La Doré (Saguenay-Lac-St-Jean, Qc) is also active against *E.coli* but not as active as against *S. aureus*. It could be possible that the essential oil used in Boucher's study was tested at higher concentrations than with the wild *A. millefolium* essential oil tested, which permitted Boucher to detect an inhibitory effect on the growth of *E. coli*. The wild essential oil has a similar chemical composition to the essential oil from Boucher's study but presents differences in the proportions in its content (Boucher 2015). The main constituents of the wild essential oil in this article are germacrene D (18.4 %), chamazulene (12.9 %) and sabinene (7.59 %). In contrast, in Boucher's study, there is less germacrene D (6.7 %) and sabinene (5.6 %) and more chamazulene (16.1 %).

The differences observed in biological activities of wild and cultivated plant extracts and the difference in the essential oil yield could be explained by environmental factors they were exposed to during their growth. Factors such as nutrients, metals, water, salinity, temperature, and radiation affect the plant's chemical content (Borges *et al.* 2017). When plants exposed to stresses such as nutrient deficiency, lack of water, and high UV solar radiation levels, they tend to produce pharmacologically active compounds, secondary metabolites (Borges *et al.* 2017). It has been demonstrated that water deficiency can affect plants' essential oil yield (Bettaieb *et al.* 2011). Tatar *et al.* (2016) studied the soil water content's effect on the essential oil yields in *A. millefolium*. They demonstrated that a deficiency or excess water augmented its essential oil yield (Tatar *et al.* 2016). Perhaps, the wild plants in this study were not exposed to the same amount of water and the same type of soil as the cultivated ones due to the agricultural practices, which resulted in a difference in essential oil yield and differences in the potency of the studied biological activities.

The differences between wild and cultivated *A. millefolium* could also be due to variability in the *A. millefolium* aggregate subspecies. This plant has 20 subspecies that differ in ploidy level, morphology and chemical composition (Benedek *et al.* 2007b). For this study, it would have been interesting to know which subspecies the wild and the cultivated *A. millefolium* belonged to and could explain the difference observed in the plant extracts' biological activities. Benedek *et al.* (2007b) studied the distribution of the phenolic compounds in the European *A. millefolium* aggregate and found variability in the chemical content between the different subspecies tested. As for the essential oil, Spinarova et Petrikova (2003), who also studied the European *A. millefolium*, demonstrated that the essential oil content and yield varied with the subspecies of the *A. millefolium* aggregate. So, the wild and cultivated *A. millefolium* could be from different subspecies.

## **2.7 Conclusion**

This study demonstrates that both the wild and cultivated *A. millefolium* have anti-inflammatory and antioxidant properties, but their potency differs. The most promising extract for cosmetic use was the cultivated leaf ethanol extract. However, this extract presents some toxicity at higher concentrations. More studies are needed on these extracts to identify which compounds are responsible for the extracts' toxicity and if they can be removed from them without reducing their anti-inflammatory and antioxidant activities. Interestingly, the cultivated plant only produced trace amounts of essential oil while the wild plant had a measurable yield. It would also be interesting to study further what types of environmental stresses influence the biological activities of *A. millefolium* and which subspecies is best for cosmetic purposes.

## 2.8 Supplementary results

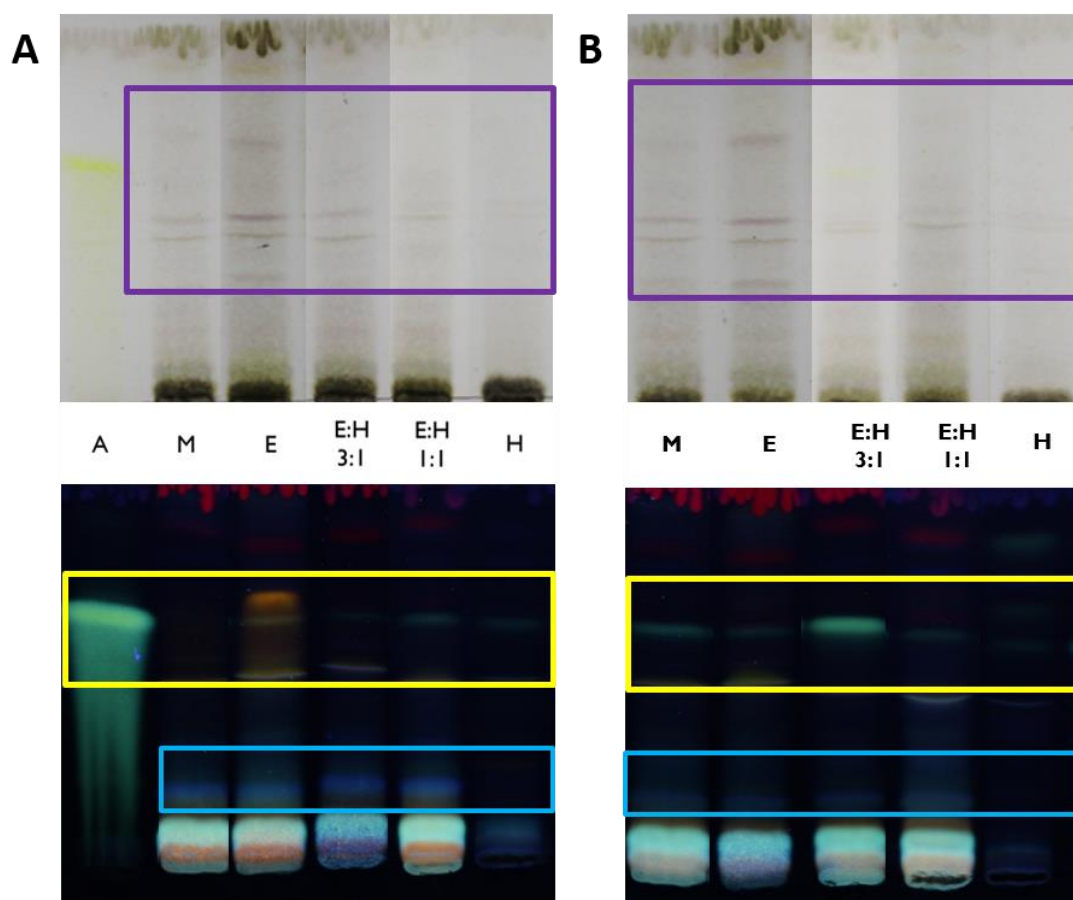


Figure 1 : TLC of wild (A) and cultivated (B) leaf extract using the mobile phase  $\text{CHCl}_3$ :  $\text{MeOH}$  :  $\text{H}_2\text{O}$ :  $\text{HCOOH}$  (50: 15 : 1: 0.1) after revelation with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in the visible (above) and with NP/PEG at 365 nm (below). Apigenin (A), methanolic extract (M), ethanolic extract (E), hydroethanolic extract (3:1) (E:H 3:1), hydroethanolic extract (1:1) (E:H 1:1) and aqueous extract (H).



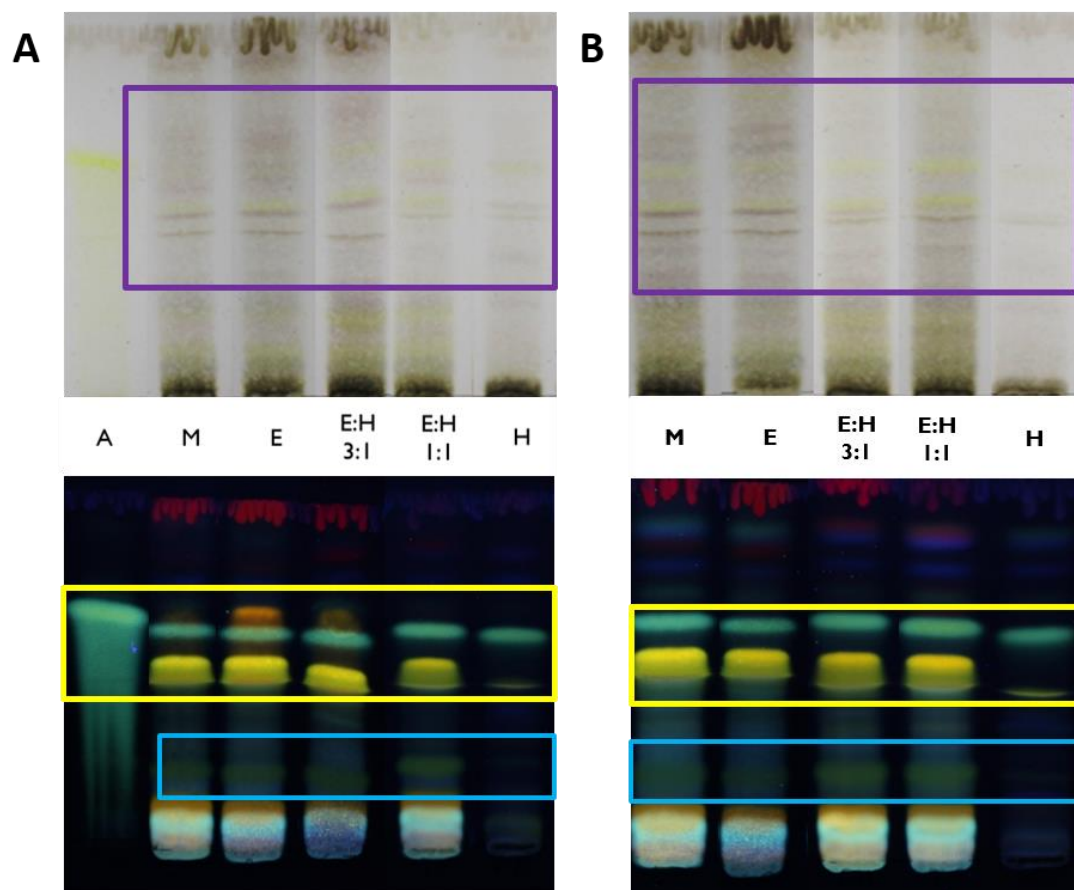
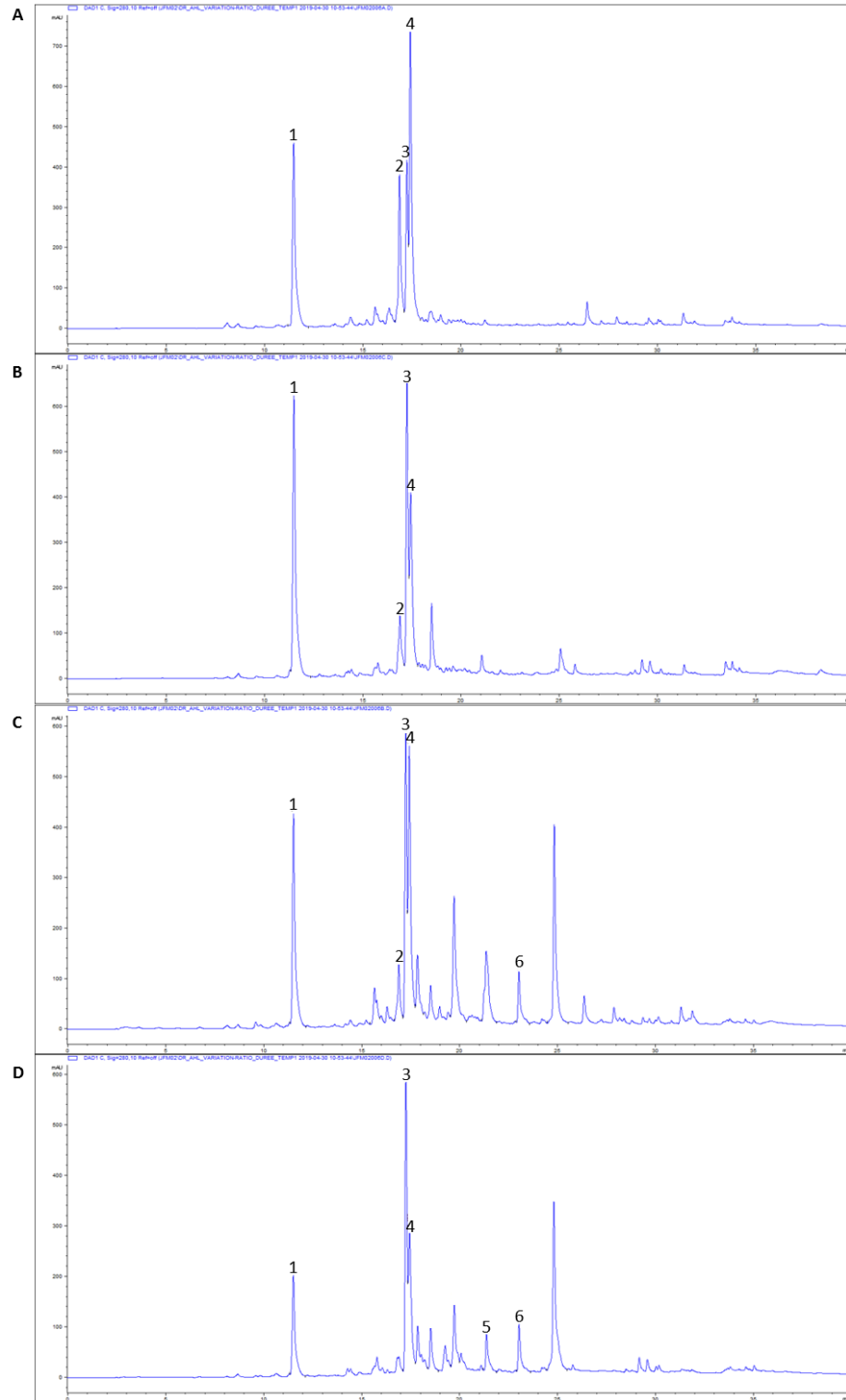


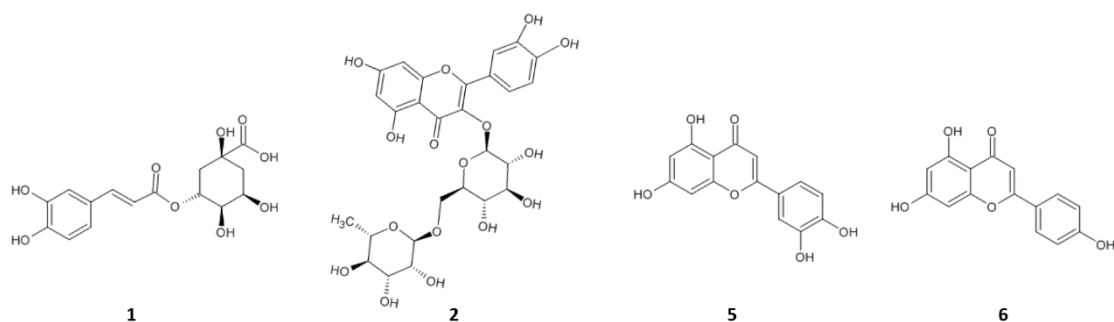
Figure 2 : TLC of wild (A) and cultivated (B) flower extracts using the mobile phase  $\text{CHCl}_3$ : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$ : HCOOH (50: 15 : 1: 0.1) after revelation with  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in the visible (above) and with NP/PEG at 365 nm (below). Apigenin (A), methanolic extract (M), ethanolic extract (E), hydroethanolic extract (3:1) (E:H 3:1), hydroethanolic extract (1:1) (E:H 1:1) and aqueous extract (H).



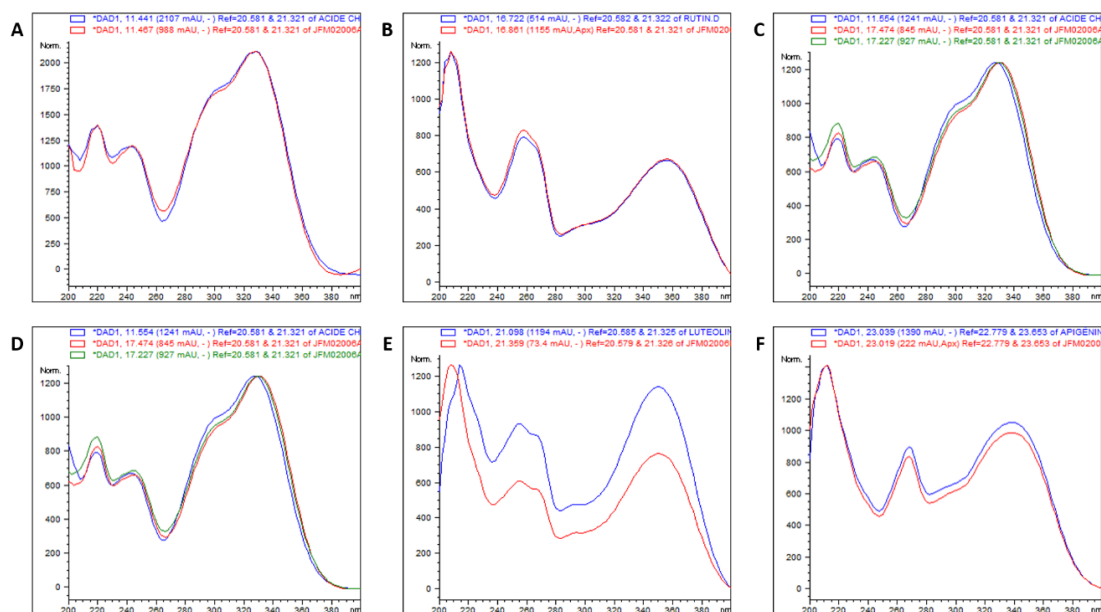
**Figure 3 : Chromatograms at 280 nm for the wild (A) and cultivated (B) leaf ethanol extracts and the wild (C) and cultivated (D) flower ethanol extracts**

**Table 10 : Identified compounds in *A. millefolium* ethanolic extracts**

Peaks	Compounds	Retention time (min)	m/z
1	Chlorogenic acid	11.5	353.1
2	Rutin	16.9	609.2
3	Dicafeoylquinic acid	17.2	515.1
4	Dicafeoylquinic acid	17.4	515.1
5	Luteolin	21.4	285.0
6	Apigenin	23.0	269.0



**Figure 4 : Chemical structure of compounds 1, 2, 5 and 6**



**Figure 5 : UV spectra of the identified compounds in the *A. millefolium* ethanolic extracts.**

Chlorogenic acid (A), rutin (B), dicafeoylquinic acids (C and D), luteolin (E) and apigenin (F).

**Table 11 : Surface area of the different compounds identified in *A. millefolium* ethanolic extracts**

Extract	Surface area of the peaks					
	1	2	3	4	5	6
Wild ETOH leaf extract	5664.9	6450.8	3674.4	8718.2	-	-
Cultivated EtOH leaf extract	7948.1	2616.2	5700.6	5439.1	-	-
Wild EtOH flower extract	5050.3	2309.0	4981.7	6393.6	-	1294.1
Cultivated EtOH flower extract	2601.2	-	5025.1	3641.0	1360.7	1164.4

## References

Agnihotri VK, Lattoo SK, Thappa RK, Kaul P, Qazi GN, Dhar AK, Saraf A, Kapahi BK, Saxena RK and Agarwal SG. 2005. Chemical variability in the essential oil components of *Achillea millefolium* agg. from different Himalayan habitats (India). *Planta Medica*, 71 : 280-283.

Ali SI, Gopalakrishnan B and Venkatesalu V. 2017. Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: a review. *Phytotherapy Research*, 31 : 1140-1161.

Amberg N and Fogarassy C. 2019. Green consumer behavior in the cosmetics market. *Resources*, 8 : 137-155.

Banfi E, Scialino G and Monti-Bragadin C. 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 : 796-800.

Benedek B, Kopp B and Melzig MF. 2007a. *Achillea millefolium* L. s.l. -- is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? *Journal of Ethnopharmacology*, 113 : 312-317.

Benedek B, Gjoncaj N, Saukel J and Kopp B. 2007b. Distribution of phenolic compounds in Middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. Chemistry & Biodiversity, 4 : 849-857.

Benetis R, Radusiene J and Janulis V. 2008. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* wild populations in Lithuania. Medicina (Kaunas), 44 : 775-781.

Bettaieb I, Knioua S, Hamrouni I, Limam F and Marzouk B. 2011. Water-deficit impact on fatty acid and essential oil composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) aerial parts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 : 328-334.

Biswas SK. 2016. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? Oxidative medicine and Cellular Longevity, 2016 : 1-9.

Borges CV, Minatel IO, Gomez-Gomez HA and Lima GPP. 2017. Medicinal plants: influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. Ghorbanpour M et Varma A eds. Medicinal Plants and Environmental Challenges. Springer, Cham, p. 259-277.

Boucher M-A. 2015. Caractérisation chimique et évaluation du potentiel antibactérien des huiles essentielles de *Tussilago farfara* (L.) et de *Tanacetum vulgare* (L.). Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, 121 p.

Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A and Akpulat HA. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, 87 : 215-220.

Choi KS, Kundu JK, Chun KS, Na HK and Surh YJ. 2014. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. Archives of Biochemistry and Biophysics, 559 : 38-45.

Choi SJ, Lee SN, Kim K, Joo da H, Shin S, Lee J, Lee HK, Kim J, Kwon SB, Kim MJ, Ahn KJ, An IS, An S and Cha HJ. 2016. Biological effects of rutin on skin aging. International Journal of Molecular Medicine, 38 : 357-363.

Chou ST, Peng HY, Hsu JC, Lin CC and Shih Y. 2013. *Achillea millefolium* L. essential oil inhibits LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 Macrophages. International Journal of Molecular Sciences, 14 : 12978-12993.

Côté H, Boucher MA, Pichette A, Roger B and Legault J. 2016. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. Journal of Ethnopharmacology, 194 : 684-689.

Farage MA, Miller KW, Elsner P and Maibach HI. 2007. Functional and physiological characteristics of the aging skin. Aging Clinical and Experimental Research, 20 : 195-200.

Farage MA, Miller KW, Elsner P and Maibach HI. 2013. Characteristics of the aging skin. Advances in Wound Care, 2 : 5-10.

Frère Marie-Victorin, Rouleau E, Brouillet L, Hay SG and Goulet I. 2002. Flore laurentienne. Gaëtan Morin Éditeur Itée, Montréal, 1093 p.

Gilbert B and Ferreira Alves L. 2003. Synergy in plant medicines. Current Medicinal Chemistry, 10 : 13-20.

Girard-Lalancette K, Pichette A and Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115 : 720-726.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr. and Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology*, 144 : 278-283.

Guo Y-F, Xu N, -N., Sun W, Zhao Y, Li C-Y and Guo M-Y. 2017. Luteolin reduces inflammation in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis by inhibiting NF-kB activation and MMPs expression. *Oncotarget*, 8 : 28481-28493.

Labunskyy VM and Gladyshev VN. 2013. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19 : 1362-1372.

Legault J, Perron T, Mshvildadze V, Girard-Lalancette K, Perron S, Laprise C, Sirois P and Pichette A. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin 7-O-beta-D-glucopyranoside from the leaves of *Brasenia schreberi*. *Journal of Medicinal Food*, 14 : 1127-1134.

Lubbe A and Verpoorte R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34 : 785-801.

Man MQ, Hupe M, Sun R, Man G, Mauro TM and Elias PM. 2012. Topical apigenin alleviates cutaneous inflammation in murine models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 : 1-7.

Moerman D. 2003. Native American Ethnobotany Database. Consulted 08/01/2018, <http://naeb.brit.org/>

O'Brien J, Wilson I, Orton T and Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 267 : 5421-5426.

Ou B, Hampsch-Woodill M and Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 : 4619-4626.

Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A and Richter K. 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5 : 545-589.

Sanchez-Marzo N, Perez-Sanchez A, Ruiz-Torres V, Martinez-Tebar A, Castillo J, Herranz-Lopez M and Barrajon-Catalan E. 2019. Antioxidant and photoprotective activity of apigenin and its potassium salt derivative in human keratinocytes and absorption in Caco-2 cell monolayers. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 : 2148-2160.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M and Iseki K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, 403 : 136-138.

Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L and Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF- $\kappa$ B and JNK/AP-1 activation. *International Immunopharmacology*, 9 : 1042-1048.



Spinarova S and Petrikova K. 2003. Variability of the content and quality of some active substances within *Achillea millefolium* complex. Horticultural Science, 30 : 7-13.

Tatar Ö, Konakchiev A, Tsonev T, Velikova V, Gesheva E, Bayram E, Vitkova A and Edreva A. 2016. Plant-soil water status-induced changes in physiological and biochemical properties of yarrow. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 19 : 1776-1787.

Tobin DJ. 2006. Biochemistry of human skin - our brain on the outside. Chemical Society Reviews, 35 : 52-67.

Venus M, Waterman J and McNab I. 2011. Basic physiology of the skin. Surgery (Oxford), 29 : 471-474.

Zhuang Y and Lyga J. 2014. Inflammaging in skin and other tissues - the role of complement system and macrophage. Inflammation & Allergy - Drug Targets, 13 : 153-161.

## CHAPITRE 3

### ÉTUDE DU POTENTIEL COSMÉCEUTIQUE D'UN EXTRAIT HYDROALCOOLIQUE DE BRASÉNIE DE SCHREBER (*BRASENIA SCHREBERI*)

#### 3.1 Résumé

Un ralentissement du renouvellement de l'épiderme, une réduction de la fonction barrière de la peau, une peau plus sèche et une structure dermique altérée ainsi que le stress oxydatif et une inflammation chronique de faible intensité sont associés au vieillissement de la peau. Lors de travaux précédents, nous avons étudié les propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes d'extraits méthanolique et aqueux de feuilles d'une plante utilisée dans la médecine traditionnelle chinoise, soit la Brasénie de Schreber. La présente étude a pour but d'examiner plus en détail l'effet d'un extrait hydroalcoolique de la Brasénie de Schreber sur des cellules en culture *in vitro* ainsi que sur un substitut de peau humaine. Nos résultats montrent que cet extrait possède des propriétés antioxydantes cellulaires avec un  $IC_{50}$  de  $0,28 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$ . Avec une concentration de  $160 \mu\text{g/mL}$ , l'extrait inhibe à  $100 \pm 6 \%$  la production d'oxyde nitrique par les macrophages RAW 264.7. L'extrait de Brasénie de Schreber est également en mesure d'induire l'expression de protéines d'intérêt cosméceutique soit l'involucrine, la loricine, la filaggrine, l'aquaporine-3 et le collagène-1 dans des substituts de peau reconstruits *in vitro* par génie tissulaire. Les activités biologiques de l'extrait à partir de ce modèle de peau humaine suggèrent une prévention au niveau du vieillissement de la peau. En stimulant la production de collagène-1, l'extrait de Brasénie de Schreber pourrait diminuer les altérations de la structure dermique associées au vieillissement. De par son effet sur l'involucrine, la filaggrine et la loricine, il pourrait aussi améliorer le renouvellement de l'épiderme et sa fonction barrière. Cet extrait pourrait également avoir un effet bénéfique sur l'hydratation de la peau grâce à son effet sur la filaggrine et l'aquaporine-3. L'extrait de Brasénie de Schreber est un ingrédient actif d'origine naturelle ayant des propriétés anti-âge prometteuses pour l'industrie cosmétique.

## POTENTIAL COSMECEUTICAL EFFECTS OF A HYROALCOHOLIC *BRASENIA SCHREBERI* EXTRACT

Jessica Fortin-Mimeault<sup>1</sup>, André Pichette<sup>1</sup>, Jean Legault<sup>1</sup>

### **Affiliations:**

<sup>1</sup>Centre de recherche sur la boréale (CREB), Laboratoire d'analyse et de séparation des essences végétales (LASEVE), Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi, Chicoutimi (Québec), Canada.

### **Address for reprint requests:**

Jean Legault, Ph.D. (Corresponding author)

Université du Québec à Chicoutimi (UQAC)

555 Boulevard de l'Université, Chicoutimi, QC G7H 2B1

Tel : (1) 418-545-5011 ext. 2334

Fax: +1 418 545 5012

E-mail : Jean.Legault@uqac.ca

### 3.2 Abstract

Aged skin is associated with a slower epidermal turnover, a reduced barrier function, dry skin and an altered dermal structure, as well as oxidative stress and chronic low-grade inflammation. We previously studied the *Brasenia schreberi* leaves, which possess interesting anti-ageing properties such as antioxidant and anti-inflammatory effects and are also used in traditional Chinese medicine. In this present study, we examine the effect of a hydroalcoholic *Brasenia schreberi* extract on cell cultures *in vitro* and on a human skin model. Results show that this extract presents cellular antioxidant properties with an  $IC_{50}$  of  $0.28 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$ . At a  $160 \mu\text{g/mL}$  concentration, the extract inhibits  $100 \pm 6 \%$  inhibition of the nitric oxide production by RAW 264.7 macrophages. This *Brasenia schreberi* extract also induces the expression of proteins of cosmeceutical interest (involucrin, loricrin, filaggrin, aquaporin-3, and collagen-1) in a human reconstructed skin model. We concluded that the extract's effects on the human skin substitutes suggest that it could prevent skin ageing. By enhancing collagen-1 production, the extract could help reduce the dermal structure alterations associated with ageing. The extract could improve the epidermal cell turnover and its barrier function by stimulating the expression of involucrin, filaggrin, and loricrin. It could also play a role in skin hydration because of its effect on filaggrin and aquaporin-3. The *Brasenia schreberi* extract is a promising anti-ageing candidate of natural origins for the cosmetic industry.

### 3.3 Introduction

Ageing is a process that results in the deterioration of biological functions and the inability to adapt to different stresses (Bennett *et al.* 2008). As the skin ages, the epidermal cell turnover is slower (Kottner *et al.* 2013), the skin's barrier function is reduced (Kottner *et al.* 2013), the skin is naturally less hydrated (Engelke *et al.* 1997), and wrinkles are more frequent (Tobin 2017). These clinical signs of ageing are, in part, caused by an alteration to older skin's response to stress, such as oxidative stress and inflammation (Labunskyy and Gladyshev 2013). Both oxidative stress and chronic low-grade inflammation (inflammaging) contribute to the ageing process (Zhuang and Lyga 2014; Rinnerthaler *et*

*al.* 2015). They are interdependent; the damages of oxidative stress can lead to inflammation and vice versa (Biswas 2016). Together, they undertake the destruction of the dermis extracellular matrix (ECM) and damage the different macromolecules present in the skin cells (nucleic acids, proteins and lipids) (Zhuang and Lyga 2014; Rinnerthaler *et al.* 2015). The accumulation of those cellular damages in the elderly eventually is reflected by the clinical signs of ageing, such as wrinkles, skin thinning, and reduced elasticity (Starr and Starr 2014; Rinnerthaler *et al.* 2015).

Because the green movement has influenced the consumers for the past few decades, the cosmetic industry is still searching for new active ingredients from natural origins (Amberg et Fogarassy 2019). The boreal forest is a vast reservoir abundant in plants (Ministre de l'Environnement 2006) that have been traditionally used and is an excellent source of potentially active plant extracts. *Brasenia schreberi*, an aquatic plant of the Cabombaceae family (Frère Marie-Victorin *et al.* 2002), was previously studied by our research team for its antioxidant and anti-inflammatory properties (Legault *et al.* 2011). This plant is used in traditional Chinese medicine to treat various disorders such as swellings, pain, edema, abscess, boils, and cancer prevention (Li *et al.* 2007; Zhou *et al.* 2011). We previously demonstrated the antioxidant and anti-inflammatory properties of aqueous and methanolic *B. schreberi* leaf extracts were in part due to gallic acid and quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside in the leaves (Legault *et al.* 2011). In this study, we first investigated the antioxidant and anti-inflammatory effect of a hydroalcoholic *B. schreberi* leaf extract on cell cultures *in vitro*. We also investigated the extract's effect on the expression of proteins of cosmeceutical interest in an *in vitro* tissue-engineered human skin substitute.

### **3.4 Materials and methods**

#### **3.4.1 Extract preparation**

The hydroalcoholic extract (EtOH: H<sub>2</sub>O, 75:25) was obtained by reflux extraction. Stock solutions were prepared in DMSO and stored at -20°C until needed. For the treatments, stock solutions

were then diluted in cell culture media. The final concentration of DMSO in the culture medium was maintained at 0.5 % (v/v) to avoid solvent cytotoxicity.

#### 3.4.2 Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay

The assay was performed as described by Ou *et al.* (2001) with modifications. This test measures the capacity of the extracts to neutralize peroxy radicals. First, the samples' dilutions and the internal standards, quercetin and trolox (both tested at 1.25 mg/mL and 5 mg/mL), were prepared and transferred in a black flat-bottom 384-wells (Greiner Bio-One). Afterwards, the fluorochrome was added. The kinetic started when the oxidant, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), was added. The plate was then read by the Fluoroskan Ascent FLTM plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) (excitation: 485 nm; emission: 538 nm) for an hour. If a sample were antioxidant, it would slow down the fluorochrome's oxidation, which, once oxidized, loses its fluorescence. So, a potent antioxidant gives slower kinetics of loss of fluorescence (Ou *et al.* 2001). The final results were calculated by comparing the net areas under the fluorescein decay curves between the blank and the samples. ORAC values were expressed in micromoles of Trolox equivalents (TE) per milligram ( $\mu\text{mol TE/mg}$ ).

#### 3.4.3 Cellular antioxidant assay

The procedure was performed as described by Girard-Lalancette *et al.* (2009). Briefly, to determine the sample's antioxidant potential, human skin fibroblasts WS-1 (ATCC CRL-1502) were seeded into a 96-well plate ( $1 \times 10^4$  cells per well) and incubated at 37°C; 5 % CO<sub>2</sub> for 24 hours. The cells were rinsed with 150  $\mu\text{L}$  of phosphate buffer saline (PBS) before incubating for 30 min with 100  $\mu\text{L}$  of 5  $\mu\text{M}$  2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) in Hanks' balanced salt solution (HBSS). Afterwards, the cells were rinsed again with PBS and incubated for one hour with the different concentrations of the tested extract and the positive standard, quercetin (concentrations tested ranged from 0 to 6.25  $\mu\text{g/mL}$ ). Then, for the oxidative stress, 200  $\mu\text{M}$  tert-butyl hydroperoxide (t-

BuOOH) was added, and the fluorescence was monitored directly after the administration of the t-BuOOH and after two hours. Measurements were performed with a plate reader (Fluoroskan Ascent FLTM, Labsystems, Milford, MA, USA) using an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. Antioxidant activity was expressed as the concentration of extract inhibiting 50 % (IC<sub>50</sub>) of DCFH oxidation (Girard-Lalancette *et al.* 2009). If a sample were antioxidant, it should be oxidized instead of the DCFH-DA. Indeed, the more a sample is antioxidant, the more the fluorochrome is protected from oxidation resulting in less important fluorescence detection. So, the more fluorescence detected, the less the sample has antioxidant properties.

#### 3.4.4 Anti-inflammatory assay

The assay was performed as described previously by Legault *et al.* (2011) Legault *et al.* (2011). Briefly, this test measures the production of nitric oxide (NO) by the macrophages RAW 264.7 (ATCC TIB-71) in the presence of *Escherichia coli* lipopolysaccharides (LPS). The macrophages were seeded into a 96-well plate ( $7.5 \times 10^4$  cells per well) and incubated for 16 hours. Afterwards, cells were treated with extract dissolved in DMSO at different concentrations or the positive control, N $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (levels tested were 250  $\mu$ M and 1 mM), and then incubated for 24 hours. To stimulate the release of NO, cells were treated with LPS (100 ng/mL) and incubated for 24 hours. After that, 100  $\mu$ L of cell supernatant was mixed with 100  $\mu$ L of Griess reagent, prepared as described by Green *et al.* (1990), and incubated at room temperature and shielded from the light for 20 min. Nitrite quantification was estimated using a NaNO<sub>2</sub> standard curve, and the absorbance was read at 540 nm using a Multiskan GO plate reader (Thermo Electron).

#### 3.4.5 Cytotoxicity assay

The test performed was previously described by Legault *et al.* (2011). Briefly, WS-1 cells were plated in flat-bottom 96-well plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells per well in 100  $\mu$ L of culture medium and to adhere for 24 hours before treatment. Increasing concentrations of the extract or positive

control, etoposide (concentrations tested ranged from 0 to 50  $\mu$ M), were then added (100  $\mu$ L per well). The cells were incubated for 48 hours in the presence or absence of these samples. Then, cytotoxicity was assessed using the resazurin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one10-oxide) reduction test (O'Brien *et al.* 2000). The fluorescence was measured on a Fluoroskan Ascent FL™ plate reader (Labsystems, Milford, MA, USA) using excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. Cytotoxicity is expressed as the lowest concentration of tested extract inhibiting 20 % or more of cell growth in comparison with untreated cells. Following the resazurin test, the quantification of DNA was performed with the Hoechst 33342 staining dye solution. From each well, supernatants were removed, and a solution of SDS 0.01 % was added to break cell membranes. Then, the 96-well plates were frozen overnight at -20°C before adding a solution of Hoechst 30  $\mu$ g/mL (100  $\mu$ L), which becomes fluorescent when it binds to the DNA (Data not shown). The fluorescence was measured using excitation and emission wavelengths of 360 nm and 460 nm, respectively. IC<sub>20</sub> was expressed as the concentration that inhibits 20 % of cellular growth.

#### 3.4.6 Patient and biopsies

All procedures involving the donor were in agreement with the Declaration of Helsinki, and performed under the guidelines of the Research Ethics Committee of the “Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Québec” (ethic code: DR-002-1121, protocol renewal approved on 30 January 2019). The donor was given adequate information to allow them to provide written consent. The skin substitutes were produced with cells from a consenting healthy donor's biopsies during a breast reduction surgery. The donor was a Caucasian female of 46 years old. Fibroblasts were extracted with the isolation method using thermolysin and collagenase (Auger *et al.* 1995). The keratinocytes were obtained with the isolation method using thermolysin and trypsin (Germain *et al.* 1993). Extracted cells were frozen in liquid nitrogen until needed for the following experiments.



#### 3.4.7 MTT assay

Normal human keratinocytes were plated into 96-well plates at  $4 \times 10^3$  cells per well with  $6.4 \times 10^3$  cells per well of murine 3T3 fibroblasts feeders. Twenty-four hours after seeding, the cells were treated with growing plant extract concentrations for 24 hours. Cells were then washed with PBS. A solution of thiazolyl blue tetrazolium bromide (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) (0.5 mg/mL) was added to each well and incubated for 4 hours at 37°C in an incubator containing 8 % CO<sub>2</sub>. Then, culture medium (0.2 mL) was aspirated and replaced with an equal volume of acidic isopropanol (EMD Chemicals, Gibbstown, NJ, USA) to dissolve the intracellular dark-blue formazan crystal formed at room temperature. The absorbance was read at 570 nm after the crystals were completely dissolved. The cytotoxicity for keratinocytes was determined by subtracting the cell viability measured in keratinocyte and feeder culture with that in feeder-alone culture as described by Poon et Burd (2004).

#### 3.4.8 *In vitro* reconstructed skin

*In vitro* reconstructed skin substitutes were produced according to the LOEX's self-assembly method (Jean *et al.* 2009; Belanger *et al.* 2019; Grenier *et al.* 2019). Briefly, human dermal fibroblasts at their sixth passage were seeded in 6-well cell culture plates and cultured in the Dulbecco-Vogt modification of Eagle's medium (DMEM) until they formed manipulable sheets. Then, these sheets were superimposed and incubated to create a new dermal layer. To create an epidermal layer, keratinocytes at their third passage were seeded on the dermal layer and were cultured in submerged conditions to promote proliferation. Keratinocytes were cultured in a combination of DMEM and Ham's F12 (3:1). Seven days later, skin substitutes were raised to the air-liquid interface and further cultured for 21 days with culture medium exempt of EGF to obtain a stratified epithelium representative of *in vivo* skin.

For the skin substitutes treatments, dilutions of the stock solutions were prepared in a culture medium on the first day of the air-liquid interface. These dilutions were added directly to the petri dish

with the skin substitutes. The skin substitutes were treated every two days throughout the week with the diluted extract. Then, samples of each skin substitute condition at days seven, 14 and 21 of the air-liquid interface were taken and analyzed by histology and immunofluorescence staining. Experiments were performed in duplicate in one independent assay.

#### 3.4.9 Histology and immunofluorescence stainings

For histological analyses, samples of each skin substitute were fixed in Histochoice® solution (Amresco, Solon, OH, USA) and embedded in paraffin wax. Five micrometre-thick sections were stained with Masson's trichrome using Weigert's hematoxylin, fuchsin-ponceau, and aniline blue dyes.

For immunofluorescence analyses, samples were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Somagen Diagnostics, Edmonton, AB, CA) and frozen in liquid nitrogen. Indirect immunofluorescence assays were performed on five µm-thick cryosections permeabilized with acetone. The antibodies used were: rabbit polyclonal anti-collagen-1 (dilution 1:400; Millipore Chemicon, Oakville, ON, CA), rabbit polyclonal anti-aquaporin-3 (dilution 1:500; Abcam, Cambridge, UK), rabbit polyclonal anti-filaggrin (dilution 1:1600; Cedarlane Covance, Burlington, ON, CA), mouse monoclonal anti-involucrin (IgG1) (dilution 1:800; Sigma, Oakville, ON, CA) and rabbit polyclonal anti-loricrin (dilution 1:500; Cedarlane Covance, Burlington, ON, CA). The secondary antibody was either donkey anti-rabbit IgG (H + L) Alexa 488 (dilution 1:1000; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) or goat anti-mouse IgG (H + L) Alexa 488 (dilution 1:1200; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cell nuclei were counterstained with Hoechst reagent 33258 (dilution 1:100; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) added to the secondary antibody solution. Negative controls consisted of the omission of primary antibodies during the labelling reaction, and frozen sections of normal human skin were used as positive controls.

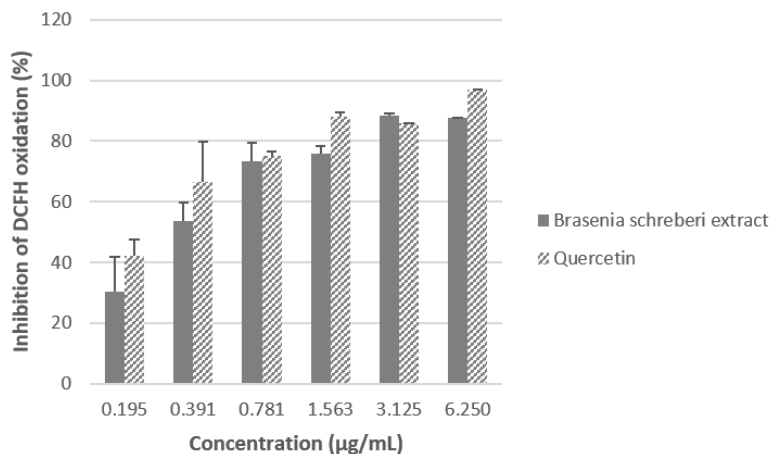
Histological and immunofluorescence sections were observed under a Zeiss Axio Imager (Carl Zeiss Canada Ltd., Toronto, ON, CA) with fixed exposure times and enhancement parameters and

photographed with an AxioCam ICc1 digital camera. The fluorescence intensity of the stainings was measured by pixel intensity using ImageJ software. The entire image was analyzed by adjusting the threshold brightness to the same value for each protein. The obtained data were used to compare the fluorescence intensity between treated and non-treated substitutes.

### **3.5 Results**

#### 3.5.1 Antioxidant activity of *Brasenia schreberi* extract

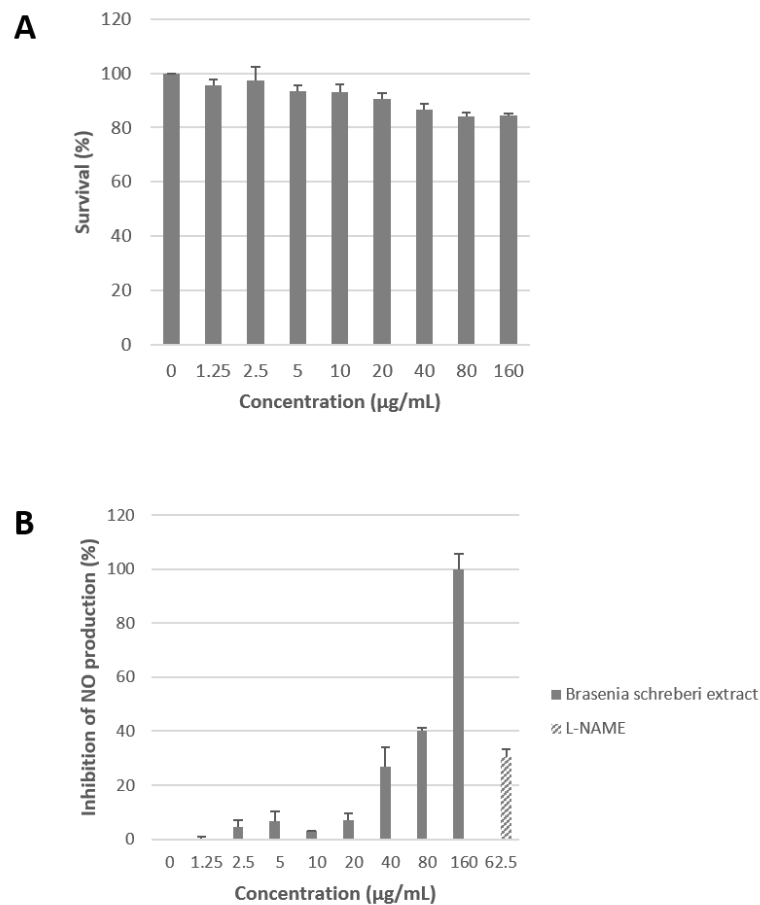
The antioxidant activities of the *B. schreberi* extract and quercetin were assessed using the ORAC assay. The *B. schreberi* extract and quercetin have ORAC values of  $2.4 \pm 0.2$  and  $21 \pm 3$   $\mu\text{mol TE/mg}$ , respectively. Figure 6 presents the protective effects of both the extract and quercetin against the oxidation of DCFH in a cell-based assay. Both the extract and the quercetin show interesting antioxidant properties. The *B. schreberi* extract has an  $\text{IC}_{50}$  of  $0.28 \pm 0.02$   $\mu\text{g/mL}$ , while quercetin has one of  $0.16 \pm 0.03$   $\mu\text{g/mL}$ .



**Figure 6 : Antioxidant activity of the *B. schreberi* extract and quercetin after absorption (60 min) by cells and subsequent exposition (90 min) to 200 µM t-BuOOH, using the cell-based assay. Data shown as the means ± standard deviation from one experiment (n=6).**

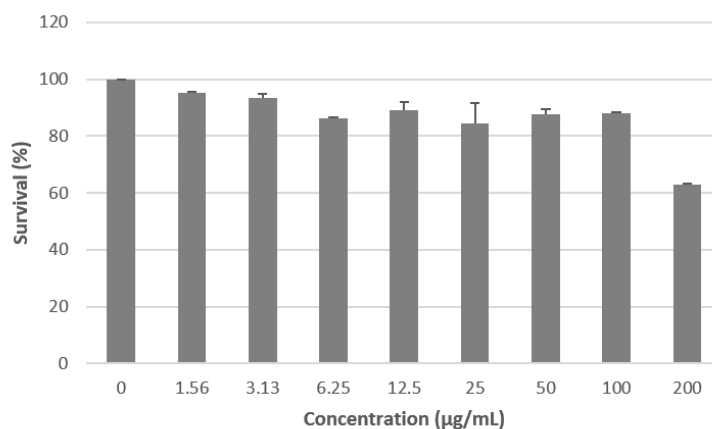
### 3.5.2 Cytotoxicity and anti-inflammatory activity of *Brasenia schreberi* extract

We studied the cytotoxicity of the *B. schreberi* extract on the murine macrophage RAW 264.7 cell line. The results shown in Figure 7A demonstrates that extract is not cytotoxic at all the tested concentrations with a survival rate of over 80 %. The *B. schreberi* extract's anti-inflammatory effect was evaluated on lipopolysaccharide-stimulated Raw 264.7 macrophages (Figure 7B). During this experiment, L-NAME was used as a positive control. Figure 7B shows that the extract at its highest concentration (160 µg/ml) almost completely inhibited nitric oxide production by the RAW 264.7 cell line, with  $100 \pm 6$  % inhibition.



**Figure 7 : Effect of the *B. schreberi* extract on the cytotoxicity (A) and the nitric oxide production (B) after stimulation of the murine macrophage cell line RAW 264.7 with lipopolysaccharide. NG-nitro-L-arginine methyl ester (62.5 µg/mL) was used as a standard. Values are reported as mean  $\pm$  standard deviation and are representative of an experiment (n=6).**

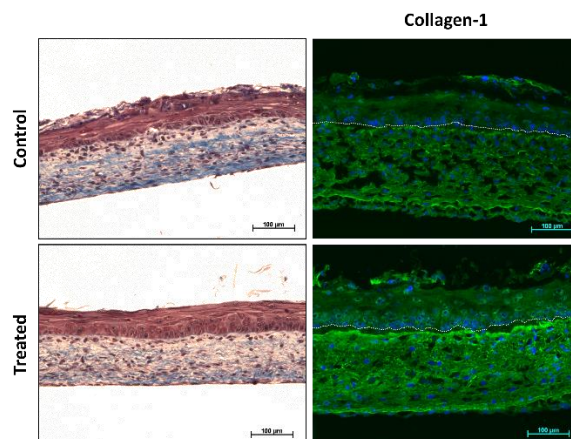
The cytotoxicity of the extract was also assessed on healthy human skin fibroblasts (WS-1). The cells were incubated for 48 hours in the presence of growing concentrations of extract ranging from 0 to 200 µg/mL. The *B. schreberi* extract does not present cytotoxicity against the WS-1 cell line at concentrations of 100 µg/ml and below, with a survival rate higher than 80 % (Figure 8).



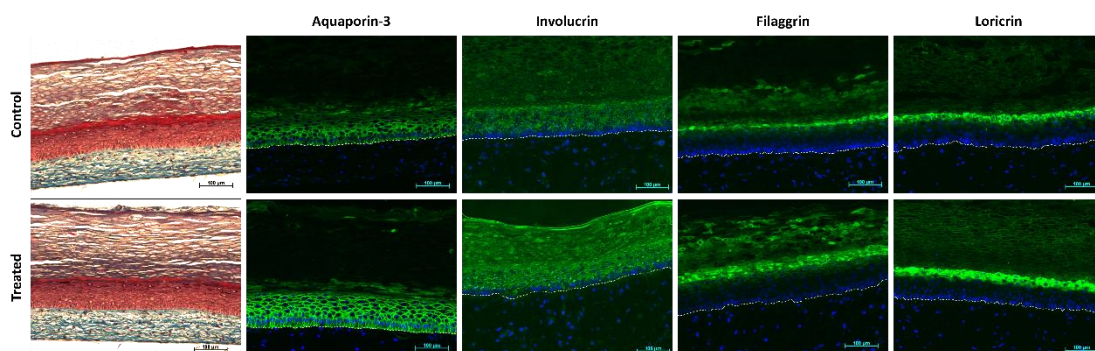
**Figure 8 : Cytotoxicity of the *B. schreberi* extract on human skin fibroblast cell line WS-1. Data shown as the means  $\pm$  standard deviation from one experiment (n=6).**

### 3.5.3 Effect of *Brasenia schreberi* extract on the expression of proteins of cosmeceutical interest

The effect of the *B. schreberi* hydroalcoholic extract on the expression of proteins of cosmeceutical interest was assessed in an *in vitro* reconstructed human skin model. With a 50 µg/mL concentration, the extract increases the expression of collagen-1 of 2.7 folds in skin substitutes on day seven of the air-liquid interface compared to the untreated control (Figure 9). With the same concentration, the extract increases the expression of aquaporin-3, involucrin, filaggrin and loricrin in skin substitutes on day 21 of 5 folds, 3.8 folds, 2.9 folds and 3.1 folds, respectively, compared to the control (Figure 10).



**Figure 9 : Expression of collagen-1 on day seven of the air-liquid interface in skin substitutes treated with 50  $\mu\text{g/mL}$  of *B. schreberi* extract (treated) or not (control) (N=1)**



**Figure 10 : Expression of aquaporin-3, involucrin, filaggrin and loricrin on day 21 of the air-liquid interface in skin substitutes treated with 50  $\mu\text{g/mL}$  of *B. schreberi* extract (treated) or not (control) (N=1)**

### 3.6 Discussion

In this present study, we first evaluated the antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities of a hydroalcoholic *B. schreberi* extract. In a previous study, these effects were investigated with water and methanol extracts and demonstrated that the methanol extract, which contains

quercetin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside has potent anti-inflammatory and antioxidant effects (Legault *et al.* 2011). Both the *B. schreberi* extract in this study and the one in our previous study present antioxidant and anti-inflammatory properties, although their extraction solvent differs (Legault *et al.* 2011). However, because methanol is considered toxic for the skin (Chan et Chan 2018), for this study, we decided to work with a greener and less harmful alternative but just as effective, a hydroethanolic extract (Capello *et al.* 2007). This extract will be more appealing to the cosmetic industry because of the consumers' preferences in products containing healthy and environmentally friendly ingredients (Amberg and Fogarassy 2019).

We also examined the effect of the hydroalcoholic *B. schreberi* extract on the expression of proteins of cosmeceutical interest on reconstructed skin substitute. We found that *B. schreberi* extract upregulates the protein expression of collagen-1, involucrin, loricrin, filaggrin and aquaporin-3. Similar results were found in previously unpublished data (see Supplementary results) with the mRNA of these proteins with an ethanolic *B. schreberi* extract.

The *B. schreberi* extract could also help prevent the alteration of dermal structure associated with ageing by stimulating the production of collagen-1. As we age, there is a decreasing content of collagen-1 in our dermis caused by a shift in the balance between its synthesis and its degradation (Lovell *et al.* 1987; Landau 2007). The *B. schreberi* extract could perhaps help restore the balance in collagen-1's synthesis and degradation. However, it could be pertinent to investigate the effect of the extract on collagenases and the production of other types of collagen found in the dermis, such as collagen VI and VII. Collagen VI and collagen VII are present in lower levels at the base of wrinkles, suggesting that they may contribute to wrinkle formation (Contet-Audonneau *et al.* 1999).

The results obtained on the skin substitute suggest that the *B. schreberi* extract can stimulate the epidermal turnover by enhancing the expression of the keratinocyte differentiation markers: involucrin, filaggrin and loricrin. Stimulating the epidermal turnover could be beneficial to prevent skin



ageing. The epidermal turnover of young adults takes about 28 days, while in the elderly requires 40 to 60 days (Grove and Kligman 1983). A slower epidermal turnover affects the skin's barrier function and healing abilities (Grove and Kligman 1983). The cornified envelope (CE) is partly composed of filaggrin, loricrin and involucrin, among others (Rinnerthaler *et al.* 2013). The CE is responsible, along with the corneocytes, lipids and junctional proteins, for the skin's barrier function (Natsuga 2014). There are changes in the CE composition with ageing, such as a lower content in loricrin and filaggrin (Rinnerthaler *et al.* 2013). An impairment in the keratinocyte differentiation and the cornified envelope could alter the corneal layer's protective barrier function, which has been associated with skin ageing (Kottner *et al.* 2013; Dos Santos *et al.* 2015). Because the *B. schreberi* extract has a positive effect on the expression of keratinocyte differentiation markers, this extract could positively affect the epidermal turnover.

The *B. schreberi* extract could prevent skin dryness linked with ageing because of its stimulating effect on aquaporin-3 and filaggrin. Aquaporin-3 plays a role in maintaining the skin's water content (Ma *et al.* 2002; Hara-Chikuma and Verkman 2008). The levels of aquaporin-3 in the epidermis decrease with age and could explain the skin dryness associated with ageing (Seleit *et al.* 2017). The *B. schreberi* extract seems to be an excellent potential hydrating extract because it upregulates the expression of aquaporin-3. Another possible cause for dry skin is a low content in natural moisturizing factors (NMF) in the *stratum corneum* (Takahashi and Tezuka 2004). NMF are by-products of the degradation of filaggrin in the inner stratum corneum (Fowler 2012; McAleer *et al.* 2018). Because filaggrin expression is lower in older skin than in younger skin, it can partially explain the link between dry skin and ageing (Takahashi and Tezuka 2004). Because the *B. schreberi* extract stimulates filaggrin expression, this extract seems promising for its effect on skin hydration.

### **3.7 Conclusion**

The hydroalcoholic *B. schreberi* extract has anti-inflammatory and antioxidant properties without cytotoxicity at effective concentrations. The extract also stimulates the expression of collagen-1, involucrin, filaggrin, loricrin and aquaporin-3 in human skin substitutes. These results suggest that the extract could prevent skin ageing by enhancing epidermal cell turnover, improving skin hydration and its barrier function and reducing dermal structure alterations. The *B. schreberi* extract is a promising anti-ageing candidate of natural origins for the cosmetic industry. However, further research is needed to confirm the effect of the extract on aged human skin cells in either an *in vitro* 3D skin ageing model or clinical trials.

### 3.9 Supplementary materials and methods

#### 3.9.1 Plant Extract

An ethanolic extract obtained by reflux extraction was used to evaluate the effect of *B. schreberi* on the gene expression of collagen type I  $\alpha 1$  and type III  $\alpha 1$ , aquaporin-3, filaggrin and involucrin in skin cells.

#### 3.9.2 Cell culture

Primary normal human epidermal keratinocytes NHEK (00192627) and primary normal human dermal fibroblasts NHDF-Ad (CC-2511) were obtained from Lonza (Basel, Switzerland). The NHEK cell line was cultivated in KGM-Gold medium (Lonza) and used between passage 3 and 5. The NHDF cell line was cultivated in FGM-2 medium (Lonza) and were used between passage 5 and 9. Both cell lines were grown in a humidified atmosphere at 37°C in 5 % CO<sub>2</sub>.

Cells were plated 6-well plates 2.5 x 10<sup>5</sup> cells per well. After incubating 16 hours, the medium was removed and replaced by a fresh medium containing different treatments. Control cells were exposed only to the vehicle or activated with 10 ng/mL of TGF- $\beta$  (R&D Systems). After 24 hours of treatment, the supernatant was removed, and the wells were rinsed with cold PBS. After completely removing the rinsing buffer, 600  $\mu$ L of lysis buffer (RLT, Qiagen) added per well.

#### 3.9.3 ARN extraction

The ARN was extracted using the RNeasy mini kit from Qiagen. Briefly, the cell lysates were first prepared with a homogenisator Precellys 24 by using ceramic microbeads before adding DNase (DNase RNase-free Set, Qiagen) to digest the genomic DNA. The lysates were then transferred to the columns to extract total ARN. The quality of the purified ARN was verified by microfluidic chromatography using a Bioanalyzer (Agilent Technologies). The concentration and the absorbance

ratios  $A_{260}/A_{280}$  and  $A_{230}/A_{260}$  were determined using the spectrophotometer NanoDrop (Thermofisher).

#### 3.9.4 RT-qPCR

For each condition, 450 ng of ARN were transcribed into complementary DNA (cDNA) using the retrotranscriptase (Superscript III mix, Invitrogen). The specific primer for each studied gene (RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assays) and the PCR buffer (RT<sup>2</sup> SYBR Green/ROX PCR Master Mix) was bought from Qiagen (Table 12). The housekeeping genes used in this experiment were hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) and TATA-binding protein (TBP). The method Delta-Delta Ct ( $\Delta\Delta C_t$ ) with the software PCR Profiler PCR Array Data Analysis (Qiagen) was used to quantify each gene's expression and compare the samples.

**Table 12 : Studied genes of cosmeceutical interest**

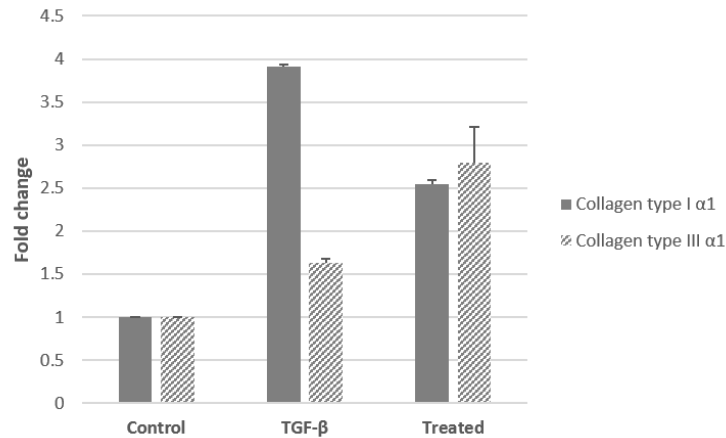
Cell type	Gene	Common name
NHEK	AQP3 NM_004925	Aquaporin-3
NHEK	FLG NM_002016	Filaggrin
NHEK	IVL NM_005547	Involucrin
NHDF	COL1A1 NM_000088	Collagen type I $\alpha 1$
NHDF	COL3A1 NM_000090	Collagen type III $\alpha 1$

#### 3.9.5 Statistical analysis

The experiment was carried in duplicates for each condition and presented as average  $\pm$  standard deviation.

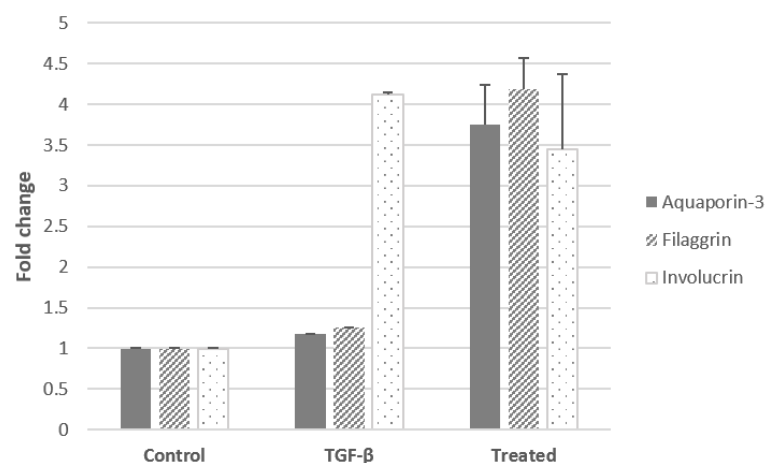
### 3.10 Supplementary results

The extract significantly upregulates collagen type I  $\alpha 1$  and type III  $\alpha 1$  expression compared to the untreated cells (Figure 11). However, the plant extract does not upregulate the collagen I $\alpha$ 1 expression as much as the TGF- $\beta$ .



**Figure 11 : Effect of 50  $\mu\text{g/mL}$  of *B. schreberi* extract on collagen synthesis in NHDF (N=1)**

The *B. schreberi* plant extract significantly upregulates aquaporin-3 and filaggrin expression in the NHEK cell line compared to the untreated and the TGF- $\beta$  activated cells (Figure 12). The aquaporin-3 expression is significantly upregulated in the TGF- $\beta$  activated cells and in the cells treated with 50  $\mu\text{g/mL}$  of *B. schreberi* extract.



**Figure 12 : Effect of 50 µg/mL *B. schreberi* extract on aquaporin-3, filaggrin and involucrin in NHEK (N=1)**

## References

- Amberg N and Fogarassy C. 2019. Green consumer behavior in the cosmetics market. *Resources*, 8 : 137-155.
- Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noël B, Goulet F and Germain L. 1995. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 31 : 432-439.
- Belanger A, Grenier A, Simard F, Gendreau I, Pichette A, Legault J and Pouliot R. 2019. Dihydrochalcone derivatives from *Populus balsamifera* L. buds for the treatment of psoriasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 : 256-270.
- Bennett MF, Robinson MK, Baron ED and Cooper KD. 2008. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, 13 : 15-19.

Biswas SK. 2016. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxidative medicine and Cellular Longevity*, 2016 : 1-9.

Capello C, Fischer U and Hungerbühler K. 2007. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry*, 9.

Chan APL and Chan TYK. 2018. Methanol as an unlisted ingredient in supposedly alcohol-based hand rub can pose serious health risk. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15 : 1440-1445.

Contet-Audonneau JL, Jeanmarie C and Pauly G. 1999. A histological study of human wrinkles structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *British Journal of Dermatology*, 140 : 1038-1047.

Dos Santos M, Metral E, Boher A, Rousselle P, Thepot A and Damour O. 2015. *In vitro* 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. *Matrix Biology*, 47 : 85-97.

Engelke M, Jensen J-M, Ekanayake-Mudiyanselage S and Proksch E. 1997. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. *British Journal of Dermatology*, 137 : 219-225.

Fowler J. 2012. Understanding the role of natural moisturizing factor in skin hydration. *Practical Dermatology*, 2012 : 36-40.

Frère Marie-Victorin, Rouleau E, Brouillet L, Hay SG and Goulet I. 2002. Flore laurentienne. Gaëtan Morin Éditeur Itée, Montréal, 1093 p.

Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier V and Auger FA. 1993. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. *Burns*, 19 : 99-104.

Girard-Lalancette K, Pichette A and Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115 : 720-726.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr. and Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *Journal of Immunology*, 144 : 278-283.

Grenier A, Gendreau I and Pouliot R. 2019. Optimization of the self-assembly method for the production of psoriatic skin substitutes. *Cell Culture*. IntechOpen, London, p. 195-211.

Grove GL and Kligman AM. 1983. Age-associated changes in human epidermal cell renewal. *Journal of Gerontology*, 38 : 134-142.

Hara-Chikuma M and Verkman AS. 2008. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128 : 2145-2151.

Jean J, Lapointe M, Soucy J and Pouliot R. 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *Journal of Dermatological Science*, 53 : 19-25.

Kottner J, Lichterfeld A and Blume-Peytavi U. 2013. Maintaining skin integrity in the aged: a systematic review. *British Journal of Dermatology*, 169 : 52 -542.



Labunskyy VM and Gladyshev VN. 2013. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19 : 1362-1372.

Landau M. 2007. Exogenous factors in skin aging. *Current Problems in Dermatology*, 35 : 1-13.

Legault J, Perron T, Mshvildadze V, Girard-Lalancette K, Perron S, Laprise C, Sirois P and Pichette A. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin 7-O-beta-D-glucopyranoside from the leaves of *Brasenia schreberi*. *Journal of Medicinal Food*, 14 : 1127-1134.

Li L, Teixeira da Silva JA and Cao B. 2007. Aquatic vegetable production and research in China. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1 : 37-42.

Lovell CR, Smolenski KA, Duance VC, Light ND, Young S and Dyson M. 1987. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *British Journal of Dermatology*, 117 : 419-428.

Ma T, Hara M, Sougrat R, Verbavatz JM and Verkman AS. 2002. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 : 17147-17153.

McAleer MA, Jakasa I, Raj N, O'Donnell CPF, Lane ME, Rawlings AV, Voegeli R, McLean WHI, Kezic S and Irvine AD. 2018. Early-life regional and temporal variation in filaggrin-derived natural moisturizing factor, filaggrin-processing enzyme activity, corneocyte phenotypes and plasmin activity: implications for atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 179 : 431-441.

Ministre de l'Environnement. 2006. La forêt boréale canadienne. Consulted le 29/03/2020, <https://www.hww.ca/fr/espaces-sauvages/la-foret-boreale-canadienne.html>

Natsuga K. 2014. Epidermal barriers. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 4 : 1-18.

O'Brien J, Wilson I, Orton T and Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European Journal of Medicinal Chemistry, 267 : 5421-5426.

Ou B, Hampsch-Woodill M and Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 : 4619-4626.

Poon VK and Burd A. 2004. *In vitro* cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. Burns, 30 : 140-147.

Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A and Richter K. 2015. Oxidative stress in aging human skin. Biomolecules, 5 : 545-589.

Rinnerthaler M, Duschl J, Steinbacher P, Salzmann M, Bischof J, Schuller M, Wimmer H, Peer T, Bauer JW and Richter K. 2013. Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin. Experimental Dermatology, 22 : 329-335.

Seleit I, Bakry OA, El Rebey HS, El-Akabawy G and Hamza G. 2017. Is aquaporin-3 a determinant factor of intrinsic and extrinsic aging? An immunohistochemical and morphometric study. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 25 : 49-57.

Starr JM and Starr RJ. 2014. Skin aging and oxidative stress. Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. Academic Press, Oxford, p. 15-22.

Takahashi M and Tezuka T. 2004. The content of free amino acids in the stratum corneum is increased in senile xerosis. *Archives of Dermatological Research*, 295 : 448-452.

Tobin DJ. 2017. Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*, 26 : 37-46.

Zhou J, Xie G and Yan X. 2011. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications: Vol. 5: Isolated Compounds T—Z, References, TCM Plants and Congeners*. Springer Science & Business Media, Berlin, 601 p.

Zhuang Y and Lyga J. 2014. Inflammaging in skin and other tissues - the role of complement system and macrophage. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 13 : 153-161.

## CHAPITRE 4

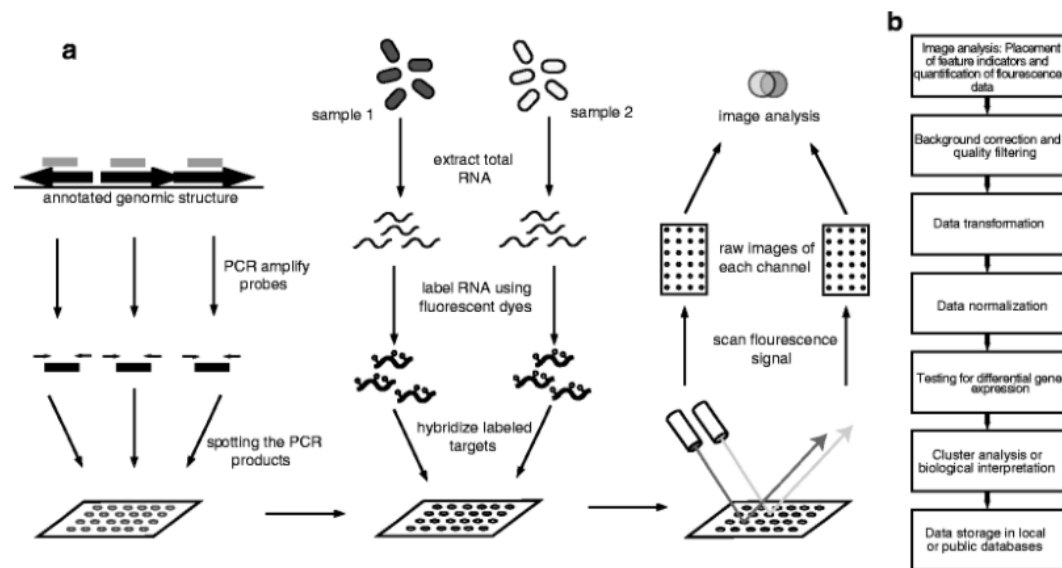
### ÉVALUATION DE L'EFFET D'UN EXTRAIT HYDROÉTHANOLIQUE DE BRASÉNIE DE SCHREBER SUR LE TRANSCRIPTOME DE FIBROBLASTES DE PEAU HUMAINE

#### 4.1 Introduction

Depuis le projet de séquençage du génome humain, plusieurs technologies ont été développées afin de traiter le génome, le transcriptome, le protéome et le microbiome dans leur entièreté (Younis *et al.* 2017). La transcriptomique est l'étude de l'ensemble des transcrits d'ARN exprimés dans un tissu spécifique (Younis *et al.* 2017). Ceci peut permettre la comparaison de transcriptomes afin d'identifier des gènes exprimés différemment entre différents types cellulaires ou encore entre différents traitements. Les études des profils transcriptomiques peuvent se faire par biopuce ou plus récemment par séquençage de nouvelle génération (Younis *et al.* 2017). Ces études permettent d'améliorer les connaissances biomédicales dans différents secteurs de recherche, dont la dermatologie. L'établissement du profil transcriptomique peut être utilisé en dermatologie pour étudier l'effet de maladies (Oestreicher *et al.* 2001), du vieillissement (Robinson *et al.* 2009), de l'exposome (He *et al.* 2004; Liao *et al.* 2020) et de traitements sur le transcriptome des cellules de la peau (Cho *et al.* 2020). L'étude du transcriptome peut permettre d'aider à élucider les différents mécanismes d'action impliqués dans ces différents processus. Il existe quelques articles qui montrent l'effet d'extraits de plantes ayant des potentiels cosméceutiques sur le transcriptome de cellules de la peau (Shin *et al.* 2013; Nanashima *et al.* 2018; Cho *et al.* 2020; Im *et al.* 2020).

Le but de ce chapitre est de présenter les résultats de l'effet d'un extrait hydroalcoolique de Brasénie de Schreber sur le transcriptome des fibroblastes de peau humaine (WS-1). Cette étude préliminaire sur biopuce à ADN pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de cet extrait de Brasénie liés aux effets antioxydants, anti-inflammatoires ainsi que sur la stimulation de protéines importantes pour la peau (ex. : collagène, filaggrine, loricrine, involucrine et aquaporine) (voir

Chapitre 3). De plus, cette étude pourrait également mener à la découverte de nouvelles applications cosméceutiques pour l'extrait de Brasénie.



Reproduit avec autorisation : Ehrenreich A. 2006. DNA microarray technology for the microbiologist : an overview. Applied Microbiology and Biotechnology, 73 : 255–273

**Figure 13 : Les étapes principales d'analyses des profils des transcrits à l'aide d'une biopuce à ADN**

La Figure 13 explique le fonctionnement d'analyses de transcriptome sur biopuce à ADN. Tout d'abord, les sondes sont générées à partir d'une séquence annotée du génome et sont placées sur une lamelle de biopuce. L'ARN est extrait de différentes conditions expérimentales et est étiqueté avec des colorants fluorescents par transcription inverse. La cible étiquetée est ensuite hybridée avec les sondes sur la biopuce. La fluorescence émise est détectée par un dispositif de balayage à barrettes. Ensuite, l'analyse des images, la filtration de la qualité, la transformation des données et la normalisation sont effectuées. (Ehrenreich 2006)

Les résultats obtenus lors de cette étude sur biopuce à ADN devront être confirmés par RT-qPCR et ensuite par immunobuvardage de type Western ou par immunofluorescence afin de s'assurer que les effets observés sur le transcriptome sont également présents au niveau protéomique. En effet, plusieurs études ont montré que les niveaux d'expression d'ARNm et de leurs protéines respectives

n'étaient pas toujours corrélés (Guo *et al.* 2008). Il sera donc important de valider que l'effet de l'extrait de Brasénie sur l'expression de l'ARNm d'un gène donné est également présent sur l'expression de sa protéine encodée du même gène.

## **4.2 Matériels et méthodes**

### **4.2.1 Culture cellulaire**

La lignée de fibroblastes de peau humaine WS-1 (ATCC CRL-1502) utilisée dans cette expérimentation provient de American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Les cellules ont été cultivées dans un milieu de culture Dulbecco's Minimum Essential Medium supplémenté avec 10 % de sérum de veau (Hyclone, Logan, UT, USA), 1x MEM Vitamins (Corning, Manassas, VA, USA), 100 IU de pénicilline et 100 µg/mL de streptomycine (Cellgro®, Mediatech, Manassas, VA, USA) dans un incubateur humidifié à une température de 37 °C avec 5 % de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture complet a été changé deux fois par semaine.

### **4.2.2 Traitements**

Les cellules de passage 15 ont étéensemencées à 2 millions de cellules par boîte de Pétri de 100 mm. Lorsque les cellules dans les boîtes de Pétri étaient confluentes, elles ont été traitées avec un extrait hydroalcoolique (EtOH:H<sub>2</sub>O 75:25) de Brasénie de Schreber obtenu par reflux. Les cellules ont été incubées avec différentes concentrations de l'extrait de Brasénie, soit 0 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL ou 100 µg/mL, et ce, pendant une heure, trois heures ou six heures. Les concentrations sélectionnées pour les traitements ne présentent pas de toxicité après un traitement de six heures; elles ont été choisies en fonction du test de cytotoxicité (0 à 200 µg/mL) effectué préalablement.

#### 4.2.3 Extraction d'ARN

À la fin des traitements, l'ARN des cellules a été extrait avec le RNeasy mini kit de Qiagen (Hilden, Allemagne). Brièvement, les cellules ont été lysées directement en utilisant 600 µl de tampon RLT (Qiagen, Allemagne). Les lysats de cellules ont ensuite été passés cinq fois dans une seringue libre d'ARNase avec une aiguille de calibre 20. Les lysats ont par la suite été transférés sur les colonnes pour extraire l'ARN total. La concentration et les ratios d'absorbance  $A_{260}/A_{280}$  et  $A_{230}/A_{260}$  ont été déterminés avec le spectrophotomètre Nanodrop (Thermofisher).

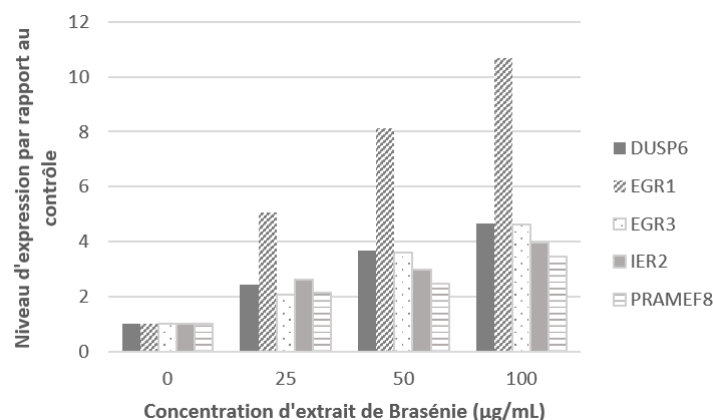
#### 4.2.4 Analyse des profils d'expression des ARNm par biopuce

L'ARN extrait a été étudié sur la biopuce Clariom S human de Affymetrix (Thermofisher) par Génome Québec. Les résultats obtenus ont ensuite été analysés avec le logiciel Transcriptome analysis Console (TAC) de Thermofisher.

### **4.3 Résultats et discussion**

L'analyse transcriptomique de fibroblastes de peau humaine a été explorée afin d'éclaircir les mécanismes d'action de l'extrait de Brasénie sur la production de collagène ainsi que sur les processus inflammatoires et oxydants. Les résultats préliminaires présentés dans cette section sont ceux dont l'expression génique est augmentée ou diminuée d'au moins un facteur deux par rapport aux cellules non traitées et qui semblent présenter une relation concentration dépendante et/ou temps dépendant.

La Figure 14 montre l'expression génique de différents gènes après une heure de traitement avec l'extrait de Brasénie de Schreber à différentes concentrations. L'expression de ces gènes semble s'accroître en fonction de la concentration croissante de l'extrait. Cependant, l'expression de ces gènes ne semble pas suivre une relation temps-dépendant (résultats non présentés). Les paragraphes suivants discuteront des gènes ressortis dans la figure ci-dessous et leurs rôles connus.



**Figure 14 : Expression génique en fonction de la concentration de l'extrait de Brasénie après une heure de traitement**

Le gène *DUSP6* est un gène codant pour une phosphatase à double spécificité qui lie spécifiquement et inactive la phospho-ERK1/2 par déphosphorylation dans les cellules des mammifères (Rhim *et al.* 2009). La protéine DUSP6 déphosphoryle ERK et empêche les signaux de croissances cellulaires (Furukawa *et al.* 2003). Ceci fait en sorte que le gène DUSP6 est considéré comme un gène suppresseur de tumeur (Toriseva *et al.* 2012).

Le gène *IER2* (connu également sous le nom *ETR101*) est un gène de réponse immédiate précoce (Rollins et Stiles 1989). Ce gène code pour la protéine IER2 qui est impliquée dans la régulation, la motilité cellulaire et l'adhésion, l'angiogenèse et l'invasion des cellules tumorales et des métastases (Neeb *et al.* 2012; Wu *et al.* 2015a; Wu *et al.* 2015b; Xu *et al.* 2017). Cette protéine est potentiellement un facteur de transcription, mais la façon dont elle est impliquée dans régulation de la transcription de gènes n'est pas encore bien comprise (Ueda *et al.* 2019).



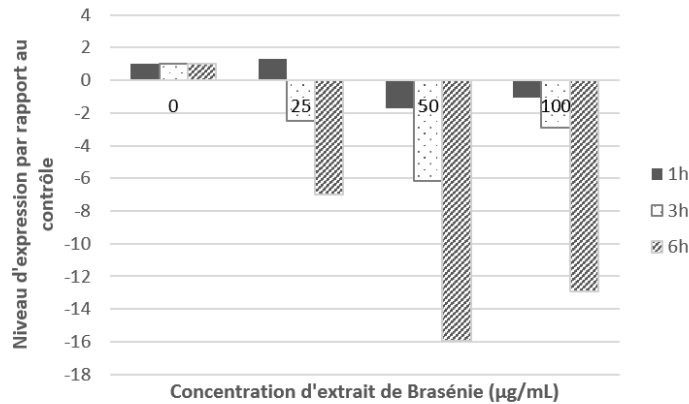
Le gène *PRAMEF8* (également connu sous le nom *PRAMEF24*) code pour une protéine qui serait impliquée dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire selon la déduction d'annotations électroniques (National Center for Biotechnology Information 2020). À ma connaissance, il n'y a pas d'article publié sur ce gène.

Le gène *EGR1* (connu également sous les noms *NGF1-A*, *TIS8*, *Krox24*, *zif268* et *ZENK*) est celui qui semble réagir le plus fortement à l'augmentation de la concentration de l'extrait. *EGR1* est un gène de réponse immédiate précoce dont l'induction de son expression est rapide et transitoire (Sukhatme *et al.* 1987). Son expression est induite par plusieurs stimuli extracellulaires tels que les rayons UV, la stimulation mécanique, l'hypoxie, les hormones et les facteurs de croissance (Havis et Duprez 2020). Ce gène code la protéine EGR1 qui fonctionne comme un régulateur de transcription impliqué dans la croissance cellulaire, la différenciation, la sénescence et l'apoptose (Rhim *et al.* 2009; Havis et Duprez 2020). L'augmentation de l'expression de l'ARNm de *EGR1* pourrait expliquer l'effet de l'extrait de Brasénie sur la production de collagène (Chapitre 3). En fait, *EGR1* stimule la production de collagène et accélère la cicatrisation (Bryant *et al.* 2000). Bryant *et al.* (2000) ont démontré que la thérapie génique avec *EGR1* dans un modèle de guérison d'une excision chez des rongeurs améliore la production de collagène, la réépithélialisation, l'angiogenèse et la contraction de la blessure. Il pourrait donc être intéressant d'étudier l'effet de l'extrait de Brasénie dans un modèle de guérison de plaies tel que le *scratch assay* sur fibroblastes de la peau pour commencer (Martinotti et Ranzato 2020). Également, il pourrait être intéressant d'étudier plus en profondeur la mécanistique derrière l'augmentation de collagène de type I induit par l'extrait de Brasénie.

Le gène *EGR3* (connu également sous le nom *PILOT*) est un gène de réponse précoce dont l'induction de son expression est retardée et soutenue comparativement à *EGR1* (O'Donovan *et al.*

1998). Ce gène code pour la protéine EGR3 laquelle est impliquée dans le cycle circadien, la réponse fibrogénique et l'immunité (Morris *et al.* 1998; Li *et al.* 2012b; Fang *et al.* 2013). Son expression est induite en réponse à des facteurs de croissance, des cytokines, l'hypoxie et aux forces mécaniques associées aux blessures et aux stress (Fang *et al.* 2013). Malgré le fait que l'effet transcriptomique de l'extrait de Brasénie a seulement été étudié sur une lignée cellulaire de fibroblastes de la peau, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de *EGR3* observée pourrait potentiellement aussi être impliquée dans l'effet de l'extrait de Brasénie sur la différenciation des kératinocytes. Kim *et al.* (2019) ont démontré que le gène *EGR3* est impliqué dans la différenciation tardive de l'épiderme. Cette hypothèse pourrait être confirmée en étudiant l'effet de l'extrait de Brasénie sur le transcriptome des kératinocytes. Ceci pourrait éclaircir les mécanismes d'action de l'extrait de la Brasénie au niveau de l'épiderme.

Les gènes *EGR1* et *EGR3* sont également impliqués dans le cycle circadien (Rusak *et al.* 1992; Morris *et al.* 1998). Puisque l'extrait de Brasénie module l'expression de *EGR1* et *EGR3*, il pourrait être également intéressant d'étudier l'effet de l'extrait de Brasénie sur le rythme circadien au niveau de la peau en étude clinique. Plusieurs paramètres de la peau sont contrôlés par le rythme circadien comme la perte d'eau insensible, la production de sébum, le pH de la peau et la circulation sanguine (Reinberg *et al.* 1996; Latreille *et al.* 2004). Il pourrait donc être intéressant d'évaluer comment l'extrait de Brasénie peut jouer sur ces paramètres contrôlés par le rythme circadien.



**Figure 15 : Effet de l'extrait de Brasénie sur expression génique de DDIT4 en fonction de la concentration et du temps**

La Figure 15 présente l'expression génique du *DDIT4* en fonction de la concentration d'extrait et de la durée du traitement. Les résultats montrent que l'expression du gène *DDIT4* semble diminuer en suivant des relations concentrations et temps dépendants. *DDIT4* (également connu sous les noms *REDD1* et *RTP801*) est un gène de réponse au stress dont l'expression est induite par l'hypoxie, l'ADN endommagé, la carence en nutriments ou en énergie, ou par des stress au niveau du réticulum endoplasmique (Ellisen *et al.* 2002; Shoshani *et al.* 2002; Brugarolas *et al.* 2004; Lin *et al.* 2005; Sofer *et al.* 2005; Wang *et al.* 2006; DeYoung *et al.* 2008). La protéine DDIT4 est un inhibiteur connu de mTOR; cependant, il n'y a pas de mTOR dans les fibroblastes de peau humaine (DeYoung *et al.* 2008; The Human Protein Atlas 2020). Il a été montré que l'expression du gène *DDIT4* est impliquée dans la régulation du stress oxydatif (Shoshani *et al.* 2002). En effet, son expression est augmentée en présence de stress oxydatif (Ellisen *et al.* 2002). Par conséquent, la diminution de l'expression du gène *DDIT4* pourrait peut-être s'expliquer par le potentiel antioxydant de l'extrait de Brasénie. D'autre part, il pourrait également être intéressant d'étudier plus en profondeur comment le pouvoir antioxydant de l'extrait de Brasénie affecte les signaux cellulaires des cellules de la peau.

#### **4.4. Conclusion**

Lors de l'analyse de l'effet transcriptomique de l'extrait hydroalcoolique de Brasénie de Schreber sur des fibroblastes de peau humaine, quelques gènes sont ressortis étant donné leur augmentation ou diminution d'expression suivant une cinétique concentration ou temps dépendants. Entre autres, EGR1, EGR3 et DDIT4 sont des gènes intéressants dont l'expression a été modulée par l'extrait. L'expression du gène EGR1, impliqué dans la synthèse de collagène et la cicatrisation, est stimulée par l'extrait de Brasénie. L'extrait stimule également l'expression du gène EGR3 qui est connu pour être impliqué dans la différenciation tardive de l'épiderme. DDIT4, dont l'expression du gène est réprimée, a été impliqué dans la régulation de divers stress cellulaires notamment oxydatifs suggérant un effet protecteur de l'extrait de Brasénie. Pour la suite des travaux, il sera important de confirmer la modulation de l'expression de gènes identifiés par qPCR ainsi que de confirmer la présence des protéines. Pour de prochaines études, il pourrait être intéressant d'étudier plus en profondeur la mécanistique derrière l'augmentation de collagène de type I et les marqueurs de différenciation tardive des kératinocytes, mais également les propriétés antioxydantes de l'extrait de Brasénie affectant les signaux cellulaires des cellules de la peau.

## CONCLUSION

Dans le cadre de ce projet de recherche, deux plantes issues de la forêt boréale, l'Achillée millefeuille (*Achillea millefolium*) et la Brasénie de Schreber (*Brasenia schreberi*), ont été étudiées pour leurs potentiels cosméceutiques à partir de plusieurs modèles *in vitro*.

Durant le premier volet du projet, des extraits et les huiles essentielles d'Achillée millefeuille de plantes sauvages et de plantes cultivées ont été comparés au niveau de leur activité biologique et de leur composition chimique. Au meilleur de nos connaissances, c'est la première étude qui compare l'activité biologique de l'Achillée millefeuille sauvage à celle cultivée. Nous avons démontré que l'Achillée millefeuille cultivée étudiée ne produisait pratiquement pas d'huile essentielle comparativement à la plante sauvage. L'huile essentielle de l'Achillée millefeuille a des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires et antibactériennes contre *S. aureus*. Les feuilles de l'Achillée millefeuille cultivée, lorsqu'extraites à l'éthanol, avaient des propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes qui rendaient cette plante intéressante pour des usages cosmétiques. Les différences en activités biologiques et en composition chimique observées chez l'Achillée millefeuille sauvage et celle cultivée peuvent s'expliquer en partie par une différence d'environnement. Lors de cette partie de projet, il aurait pu être pertinent de déterminer la sous-espèce des plantes sauvages et celles cultivées. Cette différence possible aurait pu expliquer les variations en activité biologiques des extraits et des rendements d'huiles essentielles. Pour la suite des travaux, il pourrait être intéressant d'étudier plus en profondeur l'effet de stress environnementaux sur les activités biologiques de l'Achillée millefeuille afin de déterminer les conditions optimales pour la cultiver.

Lors du deuxième volet du projet, l'effet d'un extrait de feuille de Brasénie de Schreber a été étudié sur l'expression 1) protéique et 2) transcriptomique des cellules de la peau humaine. Cette étude est la seule au meilleur de nos connaissances qui étudie l'effet des feuilles de Brasénie sur un substitut de peau. L'extrait de Brasénie de Schreber possède des propriétés antioxydantes et anti-

inflammatoires. Cet extrait augmente les niveaux protéiques de collagène-1, d'involucrine, de loricrine, de filaggrine et d'aquaporine-3 dans un substitut de peau humaine. Ces activités biologiques suggèrent que l'extrait de Brasénie de Schreber possède des propriétés anti-âge. L'extrait pourrait entre autres prévenir le vieillissement en stimulant le renouvellement de l'épiderme, en améliorant l'hydratation de la peau ainsi que sa fonction barrière et en diminuant les altérations à la structure dermique. Il pourrait être intéressant pour un prochain projet d'étudier l'effet de la Brasénie de Schreber sur un modèle 3D de peau humaine âgée ou encore en étude clinique sur la peau de personnes âgées. En ce qui concerne la seconde partie, grâce à l'étude de l'effet de la Brasénie de Schreber sur le transcriptome, nous avons identifié quelques pistes du mode d'action des effets que nous avons précédemment observés associées à cet extrait. Par exemple, la stimulation de l'expression de l'ARNm du gène *EGR1* chez les fibroblastes WS-1 sur biopuce d'ADN pourrait expliquer l'augmentation de l'expression protéique du collagène-1 au niveau du derme du substitut de peau. Les résultats obtenus de l'effet transcriptomique de la Brasénie de Schreber sur biopuce à ADN n'ont pas pu être confirmés par RT-qPCR pour l'ARNm des gènes qui nous intéressent, ainsi que par immunofluorescence ou immunobuvardage de type Western pour les protéines codées par l'ARNm. Pour un prochain projet, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur les différents mécanismes d'action de l'extrait de la Brasénie de Schreber pour bien comprendre sur quoi (récepteur, facteur de transcription ...) et de quelle manière l'extrait entraîne des effets anti-âge.

## LISTE DE RÉFÉRENCES

- Agnihotri VK, Lattoo SK, Thappa RK, Kaul P, Qazi GN, Dhar AK, Saraf A, Kapahi BK, Saxena RK et Agarwal SG. 2005. Chemical variability in the essential oil components of *Achillea millefolium* agg. from different Himalayan habitats (India). *Planta Medica*, 71 : 280-283.
- Ali SI, Gopalakrishnan B et Venkatesalu V. 2017. Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacological properties of *Achillea millefolium* L.: a review. *Phytotherapy Research*, 31 : 1140-1161.
- Allen DE et Hatfield G. 2004. *Medicinal Plants in Folk Tradition: An Ethnobotany of Britain & Ireland*. Timber Press, Inc., Portland, 431 p.
- Amberg N et Fogarassy C. 2019. Green consumer behavior in the cosmetics market. *Resources*, 8 : 137-155.
- Applequist W et Moerman D. 2011. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): a neglected panacea? A review of ethnobotany, bioactivity, and biomedical research. *Economic Botany*, 65 : 209-225.
- Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P, Temml V, Wang L, Schwaiger S, Heiss EH, Rollinger JM, Schuster D, Breuss JM, Bochkov V, Mihovilovic MD, Kopp B, Bauer R, Dirsch VM et Stuppner H. 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. *Biotechnology Advances*, 33 : 1582-1614.
- Auger FA, Lopez Valle CA, Guignard R, Tremblay N, Noël B, Goulet F et Germain L. 1995. Skin equivalent produced with human collagen. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 31 : 432-439.
- Banfi E, Scialino G et Monti-Bragadin C. 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52 : 796-800.

Belanger A, Grenier A, Simard F, Gendreau I, Pichette A, Legault J et Pouliot R. 2019. Dihydrochalcone derivatives from *Populus balsamifera* L. buds for the treatment of psoriasis. International Journal of Molecular Sciences, 21 : 256-270.

Benedek B, Kopp B et Melzig MF. 2007a. *Achillea millefolium* L. s.l. -- is the anti-inflammatory activity mediated by protease inhibition? Journal of Ethnopharmacology, 113 : 312-317.

Benedek B, Gjoncaj N, Saukel J et Kopp B. 2007b. Distribution of phenolic compounds in Middleeuropean taxa of the *Achillea millefolium* L. aggregate. Chemistry & Biodiversity, 4 : 849-857.

Benetis R, Radusiene J et Janulis V. 2008. Variability of phenolic compounds in flowers of *Achillea millefolium* wild populations in Lithuania. Medicina (Kaunas), 44 : 775-781.

Bennett MF, Robinson MK, Baron ED et Cooper KD. 2008. Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging? Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, 13 : 15-19.

Bettaieb I, Knioua S, Hamrouni I, Limam F et Marzouk B. 2011. Water-deficit impact on fatty acid and essential oil composition and antioxidant activities of cumin (*Cuminum cyminum* L.) aerial parts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 : 328-334.

Biswas SK. 2016. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? Oxidative medicine and Cellular Longevity, 2016 : 1-9.

Bolotova YV. 2015. Aquatic plants of the Far East of Russia: a review on their use in medicine, pharmacological activity. Bangladesh Journal of Medical Science, 14 : 9-13.



Borges CV, Minatel IO, Gomez-Gomez HA et Lima GPP. 2017. Medicinal plants: influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. Dans : Ghorbanpour M et Varma A éd. Medicinal Plants and Environmental Challenges. Springer, Cham, p. 259-277.

Boucher M-A. 2015. Caractérisation chimique et évaluation du potentiel antibactérien des huiles essentielles de *Tussilago farfara* (L.) et de *Tanacetum vulgare* (L.). Mémoire de maîtrise, Université du Québec à Chicoutimi, Saguenay, 121 p.

Brandenburg DM. 2010. Field guide to Wildflowers of North America. Sterling Publishing Co., Inc., Toronto, 672 p.

Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH, Hafen E, Witters LA, Ellisen LW et Kaelin WG, Jr. 2004. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & Development*, 18 : 2893-2904.

Bruneton J. 2009. Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales Éditions Tec & Doc, Paris, 1269 p.

Bryant M, Drew GM, Houston P, Hissey P, Campbell CJ et Braddock M. 2000. Tissue repair with a therapeutic transcription factor. *Human Gene Therapy*, 11 : 2143-2158.

Burk DR, Cichacz ZA et Daskalova SM. 2010. Aqueous extract of *Achillea millefolium* L. (Asteraceae) inflorescences suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophage. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4 : 225-234.

Bussmann RW, Sharon D, Vandebroek I, Jones A et Revene Z. 2007. Health for sale: the medicinal plant markets in Trujillo and Chiclayo, Northern Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3 : 37-45.

- Candan F, Unlu M, Tepe B, Daferera D, Polissiou M, Sökmen A et Akpulat HA. 2003. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology, 87 : 215-220.
- Capello C, Fischer U et Hungerbühler K. 2007. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. Green Chemistry, 9.
- Chan APL et Chan TYK. 2018. Methanol as an unlisted ingredient in supposedly alcohol-based hand rub can pose serious health risk. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15 : 1440-1445.
- Cho WK, Kim HI, Kim SY, Seo HH, Song J, Kim J, Shin DS, Jo Y, Choi H, Lee JH et Moh SH. 2020. Anti-aging effects of *Leontopodium alpinum* (Edelweiss) callus culture extract through transcriptome profiling. Genes, 11 : 230-248.
- Choi KS, Kundu JK, Chun KS, Na HK et Surh YJ. 2014. Rutin inhibits UVB radiation-induced expression of COX-2 and iNOS in hairless mouse skin: p38 MAP kinase and JNK as potential targets. Archives of Biochemistry and Biophysics, 559 : 38-45.
- Choi SJ, Lee SN, Kim K, Joo da H, Shin S, Lee J, Lee HK, Kim J, Kwon SB, Kim MJ, Ahn KJ, An IS, An S et Cha HJ. 2016. Biological effects of rutin on skin aging. International Journal of Molecular Medicine, 38 : 357-363.
- Chou ST, Peng HY, Hsu JC, Lin CC et Shih Y. 2013. *Achillea millefolium* L. essential oil inhibits LPS-induced oxidative stress and nitric oxide production in RAW 264.7 Macrophages. International Journal of Molecular Sciences, 14 : 12978-12993.

Contet-Audonneau JL, Jeanmarie C et Pauly G. 1999. A histological study of human wrinkles structures: comparison between sun-exposed areas of the face, with or without wrinkles, and sun-protected areas. *British Journal of Dermatology*, 140 : 1038-1047.

Côté H, Boucher MA, Pichette A, Roger B et Legault J. 2016. New antibacterial hydrophobic assay reveals *Abies balsamea* oleoresin activity against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Journal of Ethnopharmacology*, 194 : 684-689.

Cox PA. 1994. The ethnobotanical approach to drug discovery: strengths and limitations. Dans : *Ethnobotany and the search for new drugs*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 25 - 36.

Credence Research. 2019. Vegan beauty products market by product type (skin care, hair care, makeup, others), by distribution channel (e-commerce, hypermarkets and supermarkets, departmental stores, others) - growth, future prospects and competitive analysis, 2019 - 2027.

Crow GE et Hellquist CB. 2000. *Aquatic and Wetland Plants of Northeastern North America*. The University of Wisconsin Press, Madison, 448 p.

Daigle L et Daigle P. 2003a. *Les Fleurs Sauvages du Québec: Guide d'identification - Tome 2*. Broquet, Inc., Ottawa, 360 p.

Daigle L et Daigle P. 2003b. *Les Fleurs Sauvages du Québec: Guide d'identification - Tome 1*. Broquet Inc., Ottawa, 368 p.

David Suzuki Foundation. 2020. The Dirty Dozen: BHA and BTH. Consulté le 2/10/2020, <https://davidsuzuki.org/queen-of-green/dirty-dozen-bha-bht/>

DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D et Ellisen LW. 2008. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes & Development*, 22 : 239-251.

Dos Santos M, Metral E, Boher A, Rousselle P, Thepot A et Damour O. 2015. *In vitro* 3-D model based on extending time of culture for studying chronological epidermis aging. *Matrix Biology*, 47 : 85-97.

Duber-Smith DC. 2011. The natural personal care market. Dans : *Formulating, Packaging and Marketing of Natural Cosmetic Products*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, p. 3-14.

Duke JA. 1985. *CRC Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Boca Raton, 677 p.

Elakovich SD et Wooten JW. 1987. An examination of the phytotoxicity of the Water Shield, *Brasenia schreberi*. *Journal of Chemical Ecology*, 13 : 1935-1940.

Ellisen LW, Ramsayer KD, Johannessen CM, Yang A, Beppu H, Minda K, Oliner JD, McKeon F et Haber DA. 2002. *REDD1*, a developmentally regulated transcriptional target of p63 and p53, links p63 to regulation of reactive oxygen species. *Molecular Cell*, 10 : 995-1005.

Engelke M, Jensen J-M, Ekanayake-Mudiyanselage S et Proksch E. 1997. Effects of xerosis and ageing on epidermal proliferation and differentiation. *British Journal of Dermatology*, 137 : 219-225.

Falconeri D, Pires A, Porcedda S, Marongiu B, Gonçalves MJ, Cabral C, Cavaleiro C et Salgueiro L. 2011. Chemical composition and biological activity of volatile extracts of *Achillea millefolium*. *Natural Product Communications*, 6 : 1527-1530.

Fang F, Shangguan AJ, Kelly K, Wei J, Gruner K, Ye B, Wang W, Bhattacharyya S, Hinchcliff ME, Tourtellotte WG et Varga J. 2013. Early growth response 3 (Egr-3) is induced by transforming growth factor-beta and regulates fibrogenic responses. *The American Journal of Pathology*, 183 : 1197-1208.

Farage MA, Miller KW, Elsner P et Maibach HI. 2007. Functional and physiological characteristics of the aging skin. *Aging Clinical and Experimental Research*, 20 : 195-200.

Farage MA, Miller KW, Elsner P et Maibach HI. 2013. Characteristics of the aging skin. *Advances in Wound Care*, 2 : 5-10.

Farnsworth NR. 1994. Ethnopharmacology and drug development. Dans : *Ethnobotany and the search for new drugs*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 42-59.

Fédération des producteurs forestiers du Québec. 2019. J'aménage ma forêt: Agroforesterie et plantes comestibles. Consulté le 30/03/2020, <https://www.foretprivee.ca/jamenage-ma-foret/agroforesterie-et-plantes-comestibles/>

Feng S, Luan D, Ning K, Shao P et Sun P. 2019. Ultrafiltration isolation, hypoglycemic activity analysis and structural characterization of polysaccharides from *Brasenia schreberi*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 135 : 141-151.

Fowler J. 2012. Understanding the role of natural moisturizing factor in skin hydration. *Practical Dermatology*, 2012 : 36-40.

Fraisse D, Felgines C, Texier O et Lamaison J-L. 2011. Caffeoyl derivatives: major antioxidant compounds of some wild herbs of the *Asteraceae* family. *Food and Nutrition Sciences*, 2 : 181-192.

Frère Marie-Victorin, Rouleau E, Brouillet L, Hay SG et Goulet I. 2002. Flore laurentienne. Gaëtan Morin Éditeur Itée, Montréal, 1093 p.

Furukawa T, Sunamura M, Motoi F, Matsuno S et Horii A. 2003. Potencial tumor suppressive pathway involving DUSP6/MKP-3 in prncreatic cancer. American Journal of Pathology, 162 : 1807-1815.

Gadgoli C et Mishra SH. 2007. Antihepatotoxic activity of 5-hydroxy 3, 4', 6, 7 - tetramethoxy flavone *Achillea millefolium*. Pharmacology Online, 1 : 391-399.

Gasco-Buisson MC. 2017. Key trends driving antiaging skin care in 2009 and beyond. Dans : Textbook of Aging Skin. Springer, Berlin, p. 2189-2200.

Germain L, Rouabhia M, Guignard R, Carrier V et Auger FA. 1993. Improvement of human keratinocyte isolation and culture using thermolysin. Burns, 19 : 99-104.

Ghobadian Z, Ahmadi MR, Rezazadeh L, Hosseini E, Kokhazadeh T et Ghavam S. 2015. *In vitro* evaluation of *Achillea millefolium* on the production and stimulation of human skin fibroblast cells (HFS-PI-16). Medical Archives, 69 : 212-217.

Gilbert B et Ferreira Alves L. 2003. Synergy in plant medicines. Current Medicinal Chemistry, 10 : 13-20.

Girard-Lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: analysis of fruit and vegetable juices. Food Chemistry, 115 : 720-726.

Gleason HA et Cronquist A. 1991. Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada. New York Botanical Garden, New York, 910 p.

Goldberg AS, Mueller EC, Eigen E et Desalva SJ. 1969. Isolation of the anti-inflammatory principles from *Achilles millefolium* (Compositae). Journal of Pharmaceutical Sciences, 58 : 938-941.

Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB, Jr. et Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania* major amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. Journal of Immunology, 144 : 278-283.

Grenier A, Gendreau I et Pouliot R. 2019. Optimization of the self-assembly method for the production of psoriatic skin substitutes. Dans : Cell Culture. IntechOpen, London, p. 195-211.

Grove GL et Kligman AM. 1983. Age-associated changes in human epidermal cell renewal. Journal of Gerontology, 38 : 134-142.

Guo Y-F, Xu N, -N., Sun W, Zhao Y, Li C-Y et Guo M-Y. 2017. Luteolin reduces inflammation in *Staphylococcus aureus*-induced mastitis by inhibiting NF- $\kappa$ B activation and MMPs expression. Oncotarget, 8 : 28481-28493.

Guo Y, Xiao P, Lei S, Deng F, Xiao GG, Liu Y, Chen X, Li L, Wu S, Chen Y, Jiang H, Tan L, Xie J, Zhu X, Liang S et Deng H. 2008. How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 40 : 426-436.

Hara-Chikuma M et Verkman AS. 2008. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. Journal of Investigative Dermatology, 128 : 2145-2151.

Harris P, Hill MJ, King RT et Pierce K. 2006. Flora of North America. Oxford University Press, Inc., New York, 579 p.

Havis E et Duprez D. 2020. EGR1 transcription factor is a multifaceted regulator of matrix production in tendons and other connective tissues. *International Journal of Molecular Sciences*, 21 : 1664-1688.

He YY, Huang JL, Sik RH, Liu J, Waalkes MP et Chignell CF. 2004. Expression profiling of human keratinocyte response to ultraviolet A: implications in apoptosis. *Journal of Investigative Dermatology*, 122 : 533-543.

Hisayoshi T, Shinomura M, Konishi A, Tanaka J, Shimoda H, Hata K, Takahashi S et Yasukawa K. 2014. Inhibition of HIV-1 Reverse Transcriptase Activity by *Brasenia schreberi* (Junsai) Components. *Journal of Biological Macromolecules*, 14 : 59-65.

Hisayoshi T, Shinomura M, Yokokawa K, Kuze I, Konishi A, Kawaji K, Kodama EN, Hata K, Takahashi S, Nirasawa S, Sakuda S et Yasukawa K. 2015. Inhibition of the DNA polymerase and RNase H activities of HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 replication by *Brasenia schreberi* (Junsai) and *Petasites japonicus* (Fuki) components. *Journal of Natural Medicines*, 69 : 432-440.

Hong D-Y et Blackmore S. 2015. *The Plants of China*. Cambridge University Press, Cambridge, 475 p.

Im AR, Yeon SH, Ji KY, Son RH, Um KA et Chae S. 2020. Skin hydration effects of scale-up fermented *Cyclopia intermedia* against ultraviolet B-induced damage in keratinocyte cells and hairless mice. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020 : 1-10.

Jaric S, Popovic Z, Macukanovic-Jocic M, Djurdjevic L, Mijatovic M, Karadzic B, Mitrovic M et Pavlovic P. 2007. An ethnobotanical study on the usage of wild medicinal herbs from Kopaonik Mountain (Central Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, 111 : 160-175.

Jean J, Lapointe M, Soucy J et Pouliot R. 2009. Development of an in vitro psoriatic skin model by tissue engineering. *Journal of Dermatological Science*, 53 : 19-25.



Kazemi M. 2015. Chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of *Achillea millefolium* L., *Anethum graveolens* L., and *Carum copticum* L. essential oils. Journal of Herbal Medicine, 5 : 217-222.

Keser S, Celik S, Turkoglu S, Yilmaz O et Turkoglu I. 2013. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of water and ethanol extracts from *Achillea millefolium* L. Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences, 10 : 385-392.

Kim H, Wang Q, Shoemaker CF, Zhong F, Bartley GE et Yokoyama WH. 2014. Polysaccharide gel coating of the leaves of *Brasenia schreberi* lowers plasma cholesterol in hamsters. Journal of Traditional and Complementary Medicine, 5 : 56-61.

Kim KH, Son ED, Kim HJ, Lee SH, Bae IH et Lee TR. 2019. EGR3 is a late epidermal differentiation regulator that establishes the skin-specific gene network. Journal of Investigative Dermatology, 139 : 615-625.

Kliebenstein DJ. 2013. Making new molecules - evolution of structures for novel metabolites in plants. Current Opinion in Plant Biology, 16 : 112-117.

Kokoska L, Polesny Z, Rada V, Nepovim A et Vanek T. 2002. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. Journal of Ethnopharmacology, 82 : 51-53.

Kottner J, Lichterfeld A et Blume-Peytavi U. 2013. Maintaining skin integrity in the aged: a systematic review. British Journal of Dermatology, 169 : 52 -542.

Kultur S. 2007. Medicinal plants used in Kırklareli Province (Turkey). Journal of Ethnopharmacology, 111 : 341-364.

Labunsky VM et Gladyshev VN. 2013. Role of reactive oxygen species-mediated signaling in aging. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19 : 1362-1372.

Lacoursière E et Therrien J. 1998. Fleurs sauvages du Québec. Les Éditions de l'Homme, Montréal, 382 p.

Landau M. 2007. Exogenous factors in skin aging. *Current Problems in Dermatology*, 35 : 1-13.

Larivière R. 2007. Les plantes de la forêt boréale. Les Éditions de l'Homme, Montréal, 382 p.

Latreille J, Guinot C, Robert-Granie C, Le Fur I, Tenenhaus M et Foulley JL. 2004. Daily variations in skin surface properties using mixed model methodology. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17 : 133-140.

Legault J, Perron T, Mshvildadze V, Girard-Lalancette K, Perron S, Laprise C, Sirois P et Pichette A. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin 7-O-beta-D-glucopyranoside from the leaves of *Brasenia schreberi*. *Journal of Medicinal Food*, 14 : 1127-1134.

Les DH. 2017. Aquatic Dicotyledons of North America: Ecology, Life History, and Systematics. CRC Press, Boca Raton, 1334 p.

Li J, Liu Y, Luo J, Liu P et Zhang C. 2012a. Excellent lubricating behavior of *Brasenia schreberi* mucilage. *Langmuir*, 28 : 7797-7802.

Li L, Teixeira da Silva JA et Cao B. 2007. Aquatic vegetable production and research in China. *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 1 : 37-42.

Li S, Miao T, Sebastian M, Bhullar P, Ghaffari E, Liu M, Symonds AL et Wang P. 2012b. The transcription factors Egr2 and Egr3 are essential for the control of inflammation and antigen-induced proliferation of B and T cells. *Immunity*, 37 : 685-696.

Li Y, Ni Z-Y, Zhu M-C, Zhang K, Wu Y-B, Dong M, Shi Q-W, Huo C-H, Sauriol F, Kiyota H, Gu Y-C et Cong B. 2012c. Millifolides A–C. new 1,10-neco-guaianolides from the Flowers of *Achillea millefolium*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 67b : 438-446.

Liao Z, Nie J et Sun P. 2020. The impact of particulate matter (PM2.5) on skin barrier revealed by transcriptome analysis: Focusing on cholesterol metabolism. *Toxicology Reports*, 7 : 1-9.

Lin L, Qian Y, Shi X et Chen Y. 2005. Induction of cell stress response gene RTP801 by DNA damaging agent methyl methanesulfonate through CCAAT/enhancer binding protein. *Biochemistry*, 44 : 3909-3914.

Lise Watier Cosmétiques. 2020. Age Control Supreme. Consulté le 30/03/2020, [https://www.lisewatier.com/ca\\_fr/soins/par-gamme/age-control-supreme](https://www.lisewatier.com/ca_fr/soins/par-gamme/age-control-supreme)

Liu P, Liu Y, Yang Y, Chen Z, Li J et Luo J. 2014. Mechanism of biological liquid superlubricity of *Brasenia schreberi* mucilage. *Langmuir*, 30 : 3811-3816.

Lopes FCM, Benzatti FP, Jordao CMJ, Duarte Moreira RR et Zeppone Carlos I. 2005. Effect of the essential oil of *Achillea millefolium* L. in the production of hydrogen peroxide and tumor necrosis factor-alpha in murine macrophages. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41 : 401-405.

Lovell CR, Smolenski KA, Duance VC, Light ND, Young S et Dyson M. 1987. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *British Journal of Dermatology*, 117 : 419-428.

Lubbe A et Verpoorte R. 2011. Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials. *Industrial Crops and Products*, 34 : 785-801.

Ma T, Hara M, Sougrat R, Verbavatz JM et Verkman AS. 2002. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *The Journal of Biological Chemistry*, 277 : 17147-17153.

Man MQ, Hupe M, Sun R, Man G, Mauro TM et Elias PM. 2012. Topical apigenin alleviates cutaneous inflammation in murine models. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012 : 1-7.

Martinotti S et Ranzato E. 2020. Scratch wound healing assay. *Methods in Molecular Biology*, 2109 : 225-229.

Mazandarani M, Mirdellami SZ et Pessarakli M. 2012. Essential oil composition and antibacterial activity of *Achillea millefolium* L. from different regions in North east of Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7 : 1063-1069.

McAleer MA, Jakasa I, Raj N, O'Donnell CPF, Lane ME, Rawlings AV, Voegeli R, McLean WHI, Kezic S et Irvine AD. 2018. Early-life regional and temporal variation in filaggrin-derived natural moisturizing factor, filaggrin-processing enzyme activity, corneocyte phenotypes and plasmin activity: implications for atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*, 179 : 431-441.

Ministre de l'Environnement. 2006. La forêt boréale canadienne. Consulté le 29/03/2020, <https://www.hww.ca/fr/espaces-sauvages/la-foret-boreale-canadienne.html>

Miraldi E, Ferri S et Mostaghimi V. 2001. Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *Journal of Ethnopharmacology*, 75 : 77-87.

Misaki A et Smith F. 1962. Structure of polysaccharide of the Japanese water plant, *Brasenia Schreberi* J. F. Gmel. Agriculture and Food Chemistry, 10 : 104-108.

Moerman D. 2003. Native American Ethnobotany Database. Consulté le 08/01/2018, <http://naeb.brit.org/>

Morris ME, Viswanathan N, Kuhlman S, Davis FC et Weitz CJ. 1998. A screen of genes induced in the suprachiasmatic nucleus by light. Science, 279 : 1544-1547.

Nanashima N, Horie K, Maeda H, Tomisawa T, Kitajima M et Nakamura T. 2018. Blackcurrant anthocyanins increase the levels of collagen, elastin, and hyaluronic acid in human skin fibroblasts and ovariectomized rats. Nutrients, 10 : 495-509.

National Center for Biotechnology Information. 2020 (mis à jour le 13/03/2020). PRAMEF8 PRAME family member 8 [ Homo sapiens (human) ]. Consulté le 08/05/2020, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/391002#gene-expression>

Natsuga K. 2014. Epidermal barriers. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 4 : 1-18.

Neeb A, Wallbaum S, Novac N, Dukovic-Schulze S, Scholl I, Schreiber C, Schlag P, Moll J, Stein U et Sleeman JP. 2012. The immediate early gene *Ier2* promotes tumor cell motility and metastasis, and predicts poor survival of colorectal cancer patients. Oncogene, 31 : 3796-3806.

Nouredдини M et Rasta V-R. 2008. Analgesic effect of aqueous extract of *Achillea millefolium* L. Phamacology Online, 3 : 659-664.

O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European Journal of Medicinal Chemistry, 267 : 5421-5426.

O'Donovan KJ, Wilkens EP et Baraban JM. 1998. Sequential expression of Egr-1 and Egr-3 in hippocampal granule cells following electroconvulsive stimulation. *Journal of Neurochemistry*, 70 : 1241-1248.

Oestreicher JL, Walters IB, Kikuchi T, Gilleaudeau P, Surette J, Schwertschlag U, Dorner AJ, Krueger JG et Trepicchio WL. 2001. Molecular classification of psoriasis disease-associated genes through pharmacogenomic expression profiling. *The Pharmacogenomics Journal*, 1 : 272-287.

Ou B, Hampsch-Woodill M et Prior RL. 2001. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 : 4619-4626.

Pain S, Altobelli C, Boher A, Cittadini L, Favre-Mercuret M, Gaillard C, Sohm B, Vogelgesang B et Andre-Frei V. 2011. Surface rejuvenating effect of *Achillea millefolium* extract. *International Journal of Cosmetic Science*, 33 : 535-542.

Peng HY, Lin CC, Wang HY, Shih Y et Chou ST. 2014. The melanogenesis alteration effects of *Achillea millefolium* L. essential oil and linalyl acetate: involvement of oxidative stress and the JNK and ERK signaling pathways in melanoma cells. *PLOS One*, 9 : 1-9.

Pillai S, Oresajo C et Hayward J. 2005. Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *International Journal of Cosmetic Science*, 27 : 17 - 34.

Poon VK et Burd A. 2004. *In vitro* cytotoxicity of silver: implication for clinical wound care. *Burns*, 30 : 140-147.

Prance GT. 1994. Introduction. Dans : Ethnobotany and the search for new drugs. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, p. 1 - 3.

Reinberg AE, Touitou Y, Soudant É, Bernard D, Bazin R et Mechkouri M. 1996. Oral contraceptives alter circadian rhythms parameters of cortisol, melatonin, blood pressure, heart rate, skin blood flow, transepidermal water loss, and skin amino acids of healthy young women. *Chronobiology International*, 13 : 199-211.

Rhim JH, Jang IS, Choi JS, Kwon HJ, Yeo EJ et Park SC. 2009. Time-dependent differential gene expression in lysophosphatidic acid-treated young and senescent human diploid fibroblasts. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130 : 648-651.

Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A et Richter K. 2015. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules*, 5 : 545-589.

Rinnerthaler M, Duschl J, Steinbacher P, Salzmann M, Bischof J, Schuller M, Wimmer H, Peer T, Bauer JW et Richter K. 2013. Age-related changes in the composition of the cornified envelope in human skin. *Experimental Dermatology*, 22 : 329-335.

Robinson MK, Binder RL et Griffiths CE. 2009. Genomic driven insights into changes in aging skin. *Journal of Drugs in Dermatology*, 8 : s8-s11.

Rollins BJ et Stiles CD. 1989. Serum-inducible genes. *Advances in Cancer Research*, 53 : 1-32.

Rusak B, McNaughton L, Robertson HA et Hunt SP. 1992. Circadian variation in photic regulation of immediate early gene mRNAs in rat suprachiasmatic nucleus cells. *Molecular Brain Research*, 14 : 124-130.

Sabet Jalali FS, Tajik H et Tehrani A. 2007. Experimental evaluation of repair process of burn wound treated with aqueous extract of *Achillea millefolium* on animal model: clinical and histopathological study. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6 : 1357-1361.

Sanchez-Marzo N, Perez-Sanchez A, Ruiz-Torres V, Martinez-Tebar A, Castillo J, Herranz-Lopez M et Barrajon-Catalan E. 2019. Antioxidant and photoprotective activity of apigenin and its potassium salt derivative in human keratinocytes and absorption in Caco-2 cell monolayers. International Journal of Molecular Sciences, 20 : 2148-2160.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M et Iseki K. 2011. *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. International Journal of Pharmaceutics, 403 : 136-138.

Schneider SL et Lim HW. 2019. Review of environmental effects of oxybenzone and other sunscreen active ingredients. Journal of the American Academy of Dermatology, 80 : 266-271.

Seleit I, Bakry OA, El Rebey HS, El-Akabawy G et Hamza G. 2017. Is aquaporin-3 a determinant factor of intrinsic and extrinsic aging? An immunohistochemical and morphometric study. Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology, 25 : 49-57.

Shan J, Fu J, Zhao Z, Kong X, Huang H, Luo L et Yin Z. 2009. Chlorogenic acid inhibits lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression in RAW264.7 cells through suppressing NF-kappaB and JNK/AP-1 activation. International Immunopharmacology, 9 : 1042-1048.

Shin DH, Cha YJ, Joe GJ, Yang KE, Jang IS, Kim BH et Kim JM. 2013. Whitening effect of *Sophora flavescens* extract. Pharmaceutical Biology, 51 : 1467-1476.



Shoshani T, Faerman A, Mett I, Zelin E, Tenne T, Gorodin S, Moshel Y, Elbaz S, Budanov A, Chajut A, Kalinski H, Kamer I, Rozen A, Mor O, Keshet E, Leshkowitz D, Einat P, Skaliter R et Feinstein E. 2002. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, *RTP801*, involved in apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, 22 : 2283-2293.

Sofer A, Lei K, Johannessen CM et Ellisen LW. 2005. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Molecular and Cellular Biology*, 25 : 5834-5845.

Spinarova S et Petrikova K. 2003. Variability of the content and quality of some active substances within *Achillea millefolium* complex. *Horticultural Science*, 30 : 7-13.

Starr JM et Starr RJ. 2014. Skin aging and oxidative stress. Dans : *Aging: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*. Academic Press, Oxford, p. 15-22.

Stojanovic G, Radulovic N, Hashimoto T et Palic R. 2005. In vitro antimicrobial activity of extracts of four *Achillea* species: the composition of *Achillea clavennae* L. (Asteraceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 101 : 185-190.

Sukhatme VK, Kartha S, Toback FG, Taub R, Hoover RG et Tsai-Morris CH. 1987. A novel early growth response gene rapidly induced by fibroblast, epithelial cell and lymphocyte mitogens. *Oncogene Research*, 1 : 343-355.

Tadic V, Arsic I, Zvezdanovic J, Zugic A, Cvetkovic D et Pavkov S. 2017. The estimation of the traditionally used yarrow (*Achillea millefolium* L. Asteraceae) oil extracts with anti-inflammatory potential in topical application. *Journal of Ethnopharmacology*, 199 : 138-148.

Takahashi J, Toshima G, Matsumoto Y, Kimura F, Kiuchi T, Hamada K et Hata K. 2011. *In vitro* screening for antihyperlipidemic activities in foodstuffs by evaluating lipoprotein profiles secreted from human hepatoma cells. *Journal of Natural Medicines*, 65 : 670-674.

Takahashi M et Tezuka T. 2004. The content of free amino acids in the stratum corneum is increased in senile xerosis. *Archives of Dermatological Research*, 295 : 448-452.

Tatar Ö, Konakchiev A, Tsonev T, Velikova V, Gesheva E, Bayram E, Vitkova A et Edreva A. 2016. Plant-soil water status-induced changes in physiological and biochemical properties of yarrow. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19 : 1776-1787.

The Human Protein Atlas. 2020 (mis à jour le 06/03/2020). MTOR. Consulté le 08/05/2020, <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000198793-MTOR/tissue/skin>

Tigges J, Krutmann J, Fritsche E, Haendeler J, Schaal H, Fischer JW, Kalfalah F, Reinke H, Reifenberger G, Stuhler K, Ventura N, Gundermann S, Boukamp P et Boege F. 2014. The hallmarks of fibroblast ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, 138 : 26-44.

Tiner RW. 2009. *Field Guide to Tidal Wetland Plants of the Northeastern United States and Neighboring Canada*. University of Massachusetts Press, Amherst, 480 p.

Tobin DJ. 2006. Biochemistry of human skin - our brain on the outside. *Chemical Society Reviews*, 35 : 52-67.

Tobin DJ. 2017. Introduction to skin aging. *Journal of Tissue Viability*, 26 : 37-46.

Toriseva M, Ala-aho R, Peltonen S, Peltonen J, Grenman R et Kahari VM. 2012. Keratinocyte growth factor induces gene expression signature associated with suppression of malignant phenotype of cutaneous squamous carcinoma cells. PLOS One, 7 : 1-16.

Ueda T, Kohama Y et Sakurai H. 2019. IER family proteins are regulators of protein phosphatase PP2A and modulate the phosphorylation status of CDC25A. Cellular Signaling, 55 : 81-89.

Ugulu I et Baslar S. 2010. The determination and fidelity level of medicinal plants used to make traditional Turkish salves. The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 16 : 313-322.

Venus M, Waterman J et McNab I. 2011. Basic physiology of the skin. Surgery (Oxford), 29 : 471-474.

Vitalini S, Beretta G, Iriti M, Orsenigo S, Basilico N, Dall'Acqua S, Iorizzi M et Fico G. 2011. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity. Acta Biochimica Polonica, 58 : 203-209.

Wang H, Kubica N, Ellisen LW, Jefferson LS et Kimball SR. 2006. Dexamethasone represses signaling through the mammalian target of rapamycin in muscle cells by enhancing expression of REDD1. The Journal of Biological Chemistry, 281 : 39128-39134.

WHO. 2013. WHO traditional medicine strategy 2014-2023. publications W, Geneva.

Wojdylo A, Oszmianski J et Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. Food Chemistry, 105 : 940-949.

Wu W, Zhang X, Liao Y, Zhang W, Cheng H, Deng Z, Shen J, Yuan Q et Shen W. 2015a. miR-30c negatively regulates the migration and invasion by targeting the immediate early response protein 2 in SMMC-7721 and HepG2 cells. American Journal of Cancer Research, 5 : 1435-1446.

Wu W, Zhang X, Lv H, Liao Y, Zhang W, Cheng H, Deng Z, Shen J, Yuan Q, Zhang Y et Shen W. 2015b. Identification of immediate early response protein 2 as a regulator of angiogenesis through the modulation of endothelial cell motility and adhesion. *International Journal of Molecular Medicine*, 36 : 1104-1110.

Xiang Y, Xiang Y, Wang L et Jiao Y. 2018. Effects of coking wastewater on the growth of five wetland plant species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 100 : 265-270.

Xiao H, Cai X, Fan Y et Luo A. 2016. Antioxidant activity of water-soluble polysaccharides from *Brasenia schreberi*. *Pharmacognosy Magazine*, 12 : 193-197.

Xu Z, Zhu L, Wu W, Liao Y, Zhang W, Deng Z, Shen J, Yuan Q, Zheng L, Zhang Y et Shen W. 2017. Immediate early response protein 2 regulates hepatocellular carcinoma cell adhesion and motility via integrin beta1-mediated signaling pathway. *Oncology Reports*, 37 : 259-272.

Yassa N, Saeidnia S, Pirouzi R, Akbaripour M et Shafiee A. 2007. Three phenolic glycosides and immunological properties of *Achillea millefolium* from Iran, population of Golestan. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15 : 49-52.

Younis S, Komine M, Tomic-Canic M et Blumenberg M. 2017. Skinomics: a new toolbox to understand skin aging. Dans : *Textbook of Aging Skin*. Springer, Berlin, p. 1361-1379.

Zhou J, Xie G et Yan X. 2011. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications: Vol. 5: Isolated Compounds T—Z, References, TCM Plants and Congeners*. Springer Science & Business Media, Berlin, 601 p.

Zhuang Y et Lyga J. 2014. Inflammaging in skin and other tissues - the role of complement system and macrophage. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*, 13 : 153-161.